



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

SIIRI PIETILÄ
LANGMUIR-SCHAEFFER-KALVOJEN VALMISTAMINEN
NANOSELLULOOSASTA JA PROTEIINEISTA

Diplomityö

Tarkastajat: Yliopistonlehtori Elina
Vuorimaa-Laukkanen ja akatemiutkija
Timo Laaksonen
Teknis-luonnontieteellisen tiedekunnan
dekaani on hyväksynyt
tarkastajat ja aiheen 1.2.2017

TIIVISTELMÄ

SIIRI PIETILÄ: Langmuir-Schaeffer-kalvojen valmistaminen nanoselluloosasta ja proteiineista

Tampereen teknillinen yliopisto

Diplomityö, 81 sivua, 2 liitesivua

Kesäkuu 2017

Teknis-luonnontieteellinen koulutusohjelma

Pääaine: kemia

Tarkastajat: Yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkanen ja akatemiatutkija Timo Laaksonen

Avainsanat: nanoselluloosa, nanokiteinen selluloosa, selluloosananokuitu, laminiini, kollageeni 1, kollageeni 4, Langmuir-Schaeffer-tekniikka, ohutkalvo

Diplomityössä selvitettiin, saadaanko nanokiteisestä selluloosasta, nanokuituisesta selluloosasta ja anionisesta nanokuituisesta selluloosasta kasvatettua ohutkalvoja Langmuir-tekniikalla. Lisäksi kokeiltiin lisätä Ca^{2+} -ioneja alafaasiin kalvon rakenteen kovettamista varten ja tutkittiin niiden vaikutusta kalvon muodostumiseen. Lisäksi kokeiltiin kolmen proteiinin (laminiini, kollageeni 1 ja kollageeni 4) seostamista nanoselluloosakalvoon sen muodostamisvaiheessa. Langmuir-kalvot ovat kelluvia yksikerroksisia kalvoja; Langmuir-Blodgett-kalvot ovat kiinteälle substraatille pystysuoralla siirtotavalla siirrettyjä kalvoja ja Langmuir-Schaeffer-kalvot ovat vaakasuoralla siirtotavalla kasvatettuja kalvoja. Tässä diplomityössä käytettiin vaakasuoraa siirtotapaa, joten kalvoja kutsuttiin LS-kalvoiksi.

Kaikista kolmesta nanoselluloosamateriaaleista saatiin muodostettua kalvo pinta-aktiivista ainetta apuna käyttäen. Ilman pinta-aktiivista ainetta kalvonmuodostus ei onnistunut. Kalvoja tutkittiin käyttäen Brewsterin kulma -mikroskooppia, tunnelointimikroskooppia ja atomivoimamikroskooppia. Nanokiteisen selluloosan muodostama kalvo oli erittäin tasainen, mutta selluloosananokuiduista valmistetuissa kalvoissa oli epäsäännöllisyyksiä.

Alafaasiin lisätyt Ca^{2+} -ionit aiheuttivat nanoselluloosan silloittumista, mikä havaittiin pintapaineen jyrkempänä nousuna ja BAM-kuvissa näkyvänä pintarakenteena. Laminiinin tai kollageeni 4:n seostaminen nanoselluloosaan vaatii vielä olosuhteiden optimoimista. Kollageeni 1 sen sijaan muodosti kalvon nanokiteisen selluloosan kanssa. Työssä saatiin ensimmäistä kertaa muodostettua LS-kalvoja nanokuituisesta selluloosasta. Lisäksi tulokset proteiinien ja nanoselluloosan yhteiskalvoista ovat hyvin lupaavia mahdollisia solunkasvatussovelluksia ajatellen. Menetelmä näyttää toimivalta biomolekyylien ohutkalvojen jatkotutkimuksia varten.

ABSTRACT

SIIRI PIETILÄ: Langmuir-Schaeffer film deposition from nanocellulose and proteins
Tampere University of Technology

Master of Science thesis, 81 pages, 2 Appendix pages

June 2017

Master's Degree Programme in Natural Sciences

Major: Chemistry

Examiner: University Lecturer Elina Vuorimaa-Laukkanen and Associate Professor Timo Laaksonen

Keywords: nanocellulose, cellulose nanocrystal, cellulose nanofibril, laminin, collagen 1, collagen 4, Langmuir-Schaeffer technique, thin film

The purpose of this diploma work was to find out if it is possible to prepare thin films from cellulose nanocrystals, cellulose nanofibrils and anionic cellulose nanofibrils with the Langmuir technique. Additionally, the effect of Ca^{2+} -ions added to the subphase was studied. An attempt was also made to mix the nanocellulose with three proteins (laminin, collagen 1 and collagen 4) at the air-subphase interface. The floating monolayers are referred to as Langmuir films, vertically to solid substrate deposited monolayers as Langmuir-Blodgett films and horizontally deposited films as Langmuir-Schaeffer films. In this study the films were deposited with Langmuir-Schaeffer method.

All three nanocellulose materials formed a Langmuir film at the air-subphase interface together with a cationic surfactant. Without the cationic surfactant no film was formed. The prepared films were studied with Brewster Angle Microscope, Scanning Electron Microscope and Atomic Force Microscope. The cellulose nanocrystal films were very smooth, but there were irregularities in the films formed by both cellulose nanofibrils.

Ca^{2+} -ions that were added to the subphase produced cross-linking of the nanocellulose. This was observed as a steeper rise in surface pressure-area isotherm and as a surface structure visible in BAM-images. The nanocellulose films mixed with laminin or collagen 4 require further optimization of the preparation conditions. However, collagen 1 formed a film with cellulose nanocrystals. For the first time, LS films were successfully deposited from cellulose nanofibrils. Moreover, the results of protein mixed nanocellulose films are very promising considering potential cell cultivation applications. The method utilized in this study seems promising for further studies of biomolecular thin films.

ALKUSANAT

Diplomityö on kirjoitettu Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laboratoriolle. Kiitän työni ohjaajia yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkasta ja akatemiatutkija Timo Laaksosta kiinnostavasta aiheesta, hyödyllisistä neuvoista ja loppumattomasta hyväntahtoisuudesta.

Lisäksi haluan kiittää tohtorikoulutettava Kirsi Virkkiä SEM-näytteiden kuvaamisesta ja Alessandra Griffoa Aalto-yliopistosta AFM-näytteiden kuvaamisesta. Suureksi avuksi oli myös laboratoriomestari Anne-Maarit Tikkanen, joka järkkymättömän kärsivällisesti etsi kanssani sopivia suodatinpapereita, ratkaisi monia käytännön ongelmia ja ehti joka välissä vastailla lukuisiin kysymyksiini. Kiitos myös Katleena Kortesuolle puuttuvien pilkkujen metsästämisestä ja muiden työssäni esiintyneiden kielioppivirheiden korjaamisesta.

Erityisesti haluan kuitenkin kiittää Kaisa Rautaniemeä ja muuta työhuoneemme väkeä. Kuvankäsittelyn kummallisuuksista ja tavutustaisteluista vaihdetut vinkit olivat erittäin hyödyllisiä, mutta tekemisen ilon ja työmotivaation kannalta vertais-tuki ja mukava seura olivat korvaamattomia.

Tampere, 23.5.2017

Siiri Pietilä

LYHENTEET JA MERKINNÄT

2xPBS	kaksinkertainen fosfaattipuskuroitu suolaliuos
AFM	atomivoimamikroskooppi (Atomic Force Microscope)
BAM	Brewsterin kulma -mikroskooppi (Brewster Angle Microscope)
DODA	dioktadekyylidimetyyliammonium-ioni
DPBS	Dulbecco'n fosfaattipuskuroitu suolaliuos
G	kaasu (Gas)
IR	infrapuna (Infra Red)
LB	Langmuir-Blodgett
LC	tiivistynyt neste (Liquid Condensed)
LE	laajentunut neste (Liquid Expanded)
LS	Langmuir-Schaeffer
PTFE	poly(tetrafluoroetyleni)
S	kiinteä (Solid)
SEM	tunnelointimikroskooppi (Scanning Electron Microscope)
TEMPO	2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyyli
TMSC	trimetyylisilyyliselluloosa

A	kalvon pinta-ala
A_L	yksikerroksen pinta-alan pieneneminen
A_S	päällystetyn substraatin pinta-ala
$m - \%$	massaprosentti
mma	molekyylin keskipinta-ala (mean molecular area)
N_M	molekyylien kokonaismäärä

γ	kalvon peittämän pinnan pintajännitys
γ_0	puhtaan nesteen pintajännitys
θ_B	Brewsterin kulma
Π	pintapaine
τ	siirtosuhte

SISÄLLYSLUETTELO

1. Johdanto	1
2. Yksikerroksiset kalvot	3
2.1 Pintakemiaa	4
2.2 LB- ja LS-menetelmien toimintaperiaate	5
2.2.1 Laitteisto	6
2.2.2 Puhtaus	8
2.2.3 II-A-isotermi	10
2.2.4 LB-kalvon kasvatus	13
2.2.5 LS-kalvon kasvatus	16
2.3 Kalvojen kuvaaminen isotermin puristamisen aikana	17
2.4 LB- ja LS-menetelmien käyttötarkoitus	18
3. Nanoselluloosa	20
3.1 Selluloosan rakenne ja ominaisuudet	20
3.1.1 Selluloosan rakenne	20
3.1.2 Ominaisuudet	22
3.2 Nanoselluloosan käyttötarkoitukset	22
3.3 Nanoselluloosan valmistukseen käytetyt lähdemateriaalit	23
3.4 Nanokiteisen selluloosan valmistus	25
3.5 TEMPO-välitteinen hapetus	26
4. Kalvojen valmistus selluloosamateriaaleista	28
4.1 Kalvojen valmistus nanokiteisestä selluloosasta	28
4.2 Ca^{2+} -ionien vaikutus	29
4.3 Proteiinit	30
5. Kokeelliset menetelmät	32
5.1 Nanokiteisen selluloosan valmistus	32
5.1.1 Selluloosan jauhaminen	32
5.1.2 Rikkihappohydrolyysi	33

5.1.3	Sentrifugointi	35
5.1.4	Dialysointi	35
5.1.5	Sonikointi	36
5.1.6	Hartsipuhdistus	36
5.1.7	Suodatus	37
5.1.8	Gravimetrinen analyysi	37
5.2	Nanokuituisen selluloosan käsittely	38
5.3	Langmuir-kalvojen valmistus	39
5.4	Langmuir-Schaeffer-kalvojen valmistus	40
5.5	Kalvojen analysointi	41
6.	Tulokset	44
6.1	Nanokuituiset selluloosat	47
6.2	Kalsium	55
6.3	Proteiinit	57
7.	Yhteenveto ja johtopäätökset	69
	Lähteet	71
	LIITE A. Lisää SEM-kuvia	82

1. JOHDANTO

Diplomityön tarkoituksena oli vastata kahteen pääkysymykseen. Ensimmäinen kysymyksistä oli, saadaanko nanoselluloosasta muodostettua ohutkalvoja Langmuir-tekniikalla. Entuudestaan tiedettiin, että nanokiteisestä selluloosasta on valmistettu kalvoja Langmuir-Schaeffer-tekniikalla kationisen pinta-aktiivisen aineen avulla [1]. Kiinnostuksen kohteena oli laajentaa kalvon valmistaminen nanokiteisestä selluloosasta erilaisiin selluloosananokuituihin (selluloosananokuitu ja anioninen selluloosananokuitu) ja mahdollisuuksien mukaan valmistaa kalvo ilman kationisia pinta-aktiivisia aineita.

Toinen pääkysymys oli, sitovatko kalvot proteiineja, jos kalvot saadaan muodostettua. Tavoitteena oli kokeilla proteiinien (laminiini, kollageeni 1 ja kollageeni 4) seostamista selluloosakalvoon kalvon muodostamisvaiheessa. Ennalta tiedettiin, että valmiiseen selluloosakalvoon proteiinien tarttuminen on tyypillisesti vähäistä, joten olisi houkuttelevaa saada ne mukaan jo kalvon valmistusvaiheessa.

Langmuir-kalvoiksi kutsutaan kelluvia yksikerroksisia kalvoja [2]. Ilma-vesi-raja-pintaan muodostuvaa liukenematonta yhden molekyylin paksuista kalvoa voidaan puristaa, kunnes se saavuttaa sopivan pintapaineen [3]. Silloin se voidaan siirtää veden pinnalta halutulle kiinteälle substraatille kuin matto [4]. Prosessia, jossa yksikerros siirtyy kiinteälle substraatille, kun substraattia liikutellaan yksikerrospinnan läpi pystysuoraan, kutsutaan Langmuir-Blodgett-menetelmäksi [3]. Tässä diplomityössä on käytetty vaakasuoraa siirtotapaa, joten kalvoja kutsutaan Langmuir-Schaeffer-kalvoiksi (LS-kalvot).

Laminiineilla on elimistössä sekä yhteisiä että kullekin tyyppille ominaisia tehtäviä. Niiden tärkein yhteinen tehtävä on vuorovaikuttaa tyvikalvon vieressä olevien solujen solukalvoon kiinnittyneiden reseptorien kanssa. Tällä tavoin laminiinit säätelevät useita solun toimintoja ja viestitysreittejä. [5] Laminiinit myös muodostavat tyvikalvojen rungon [6]. Jokainen tyvikalvo sisältääkin vähintään yhtä laminiinityyppiä, jonka rakenne suureksi osaksi määrittää kullekin kehon tyvikalvolle luonteenomaiset fysiologiset ominaisuudet [5]. Tyvikalvo tukee solukalvoa ja vähentää siihen kohdistuvaa mekaanista kuormitusta [6]. Lähinnä laminiinin ansiosta tyvikalvot myös

pitävät solut ja kudokset yhdessä [5].

Sitomiskykynsä vuoksi kollageenit voivat toimia lääkeaineiden ja kasvutekijöiden kuljettajina sekä solujen kantajina [7]. Kollageenia käytetään laajamittaisesti useissa sovelluskohteissa niin maataloudessa kuin ruoka- ja lääketieteellisyydessäkin [8], sillä kollageenit ovat biohajoavia, niitä on mahdollista eristää suuria määriä eivätkä ne aiheuta immuunivastetta elimistössä [7]. Kollageenilla on kuitenkin heikot mekaaniset ja lämpöominaisuudet [8], joiden parantamiseksi se pitää seostaa johonkin muihin aineisiin.

Laminiinit ja kollageenit muodostavat molemmat rakenteita, joiden pintaan solut voivat tarttua. Ne ovat solukasvatusalustoja, jotka eivät ole haitallisia tai myrkyllisiä elävälle kudokselle. Selluloosa on inertti ja biohajoava materiaali, joten myös sitä olisi mahdollista käyttää biologisissa sovelluksissa. Proteiinien seostaminen selluloosaan avaakin erittäin mielenkiintoisia mahdollisuuksia esimerkiksi solunkasvatussovelluksiin.

2. YKSIKERROKSISET KALVOT

Yksikerroksisten kalvojen kehitys on ollut hidasta, ja kehitysprosessi on kestänyt kauan. Ensimmäisenä yksikerroksisten kalvojen käyttäytymistä yritti tieteen keinoin selittää Benjamin Franklin (1706-1790) [2]. Hän kiinnostui asiasta nähdessään laivan seilaavan tyvenessä tuulisena päivänä. Kapteeni kertoi hänelle sen johtuvan laivasta lasketuista rasvaisista vesistä. Myöhemmin eräänä tuulisena päivänä hän kokeili tätä laittamalla pienen määrän öljyä lammikon pinnalle. Teelusikallinen öljyä levisi veden pinnalle ja tynnytti neljänneksen lammikosta peilityneksi. Hän kiinnitti huomiota siihen, miten pisara öljyä jää peilin tai marmoripöydän päällä paikoilleen leviten hyvin vähän, mutta veden pinnalla leviää laajalle alueelle sateenkaaren värejä heijastavaksi ohueksi kalvoksi. [9] Franklinin kuvausta Royal Society:lle käytettiin monta kertaa 1800-luvulla tutkimuksen pohjana [2].

Lordi Rayleigh (1842-1919) tutki oliiviöljykerroksen vaikutusta veden pintajännitykseen [2]. Hän sai selville, että oliiviöljykerroksen paksuus oli 1-2 nm, tarkemmin arvioituna 1,6 nm [10]. Rayleigh uskoi, että öljykalvot veden pinnalla laajenivat, kunnes ne olivat yhden molekyylin paksuisia. Niinpä mittaamalla kalvon paksuus saataisiin selville orgaanisen molekyylin koko. [2]

Agnes Pockels (1862-1935) kehitti tekniikan, johon kaikki myöhempi työ Langmuir-kalvojen parissa perustuu. Hän täytti suorakulmaisen tina-altaan (70 cm x 5 cm x 2 cm) piripintaan vedellä. Sen päälle hän asetti 1,5 cm leveän tinaliuskan siten, että se oli juuri ja juuri kosketuksissa veteen. Siirtämällä liuskaa hän pystyi puhdistamaan veden pinnan ja muuttamaan sen pinta-alaa. Tällä tavalla hän tutki öljyllä kontaminoidun vedenpinnan pintajännityksen vaihtelua, ja huomasi, että pinnan puhdistaminen ennen mittausta oli välttämätöntä mittauksen onnistumiseksi. Pockels julkaisi myös ensimmäiset paine-pinta-ala-isotermi, jotka ovat nykyään yksikerrostutkimuksen perusmenetelmä. [2]

Irving Langmuir (1881-1957) julkaisi kuuluisan teoriansa 1915. Hän todisti, että hänen kalvonsa olivat yhden molekyylin paksuisia, ja että molekyylit olivat järjestäytyneet veden pinnalle poolinen ryhmä uponneena veteen ja pitkä pooliton ketju lähes pystysuorassa veden pinnasta. Hänen kokeensa myös selittivät, miksi

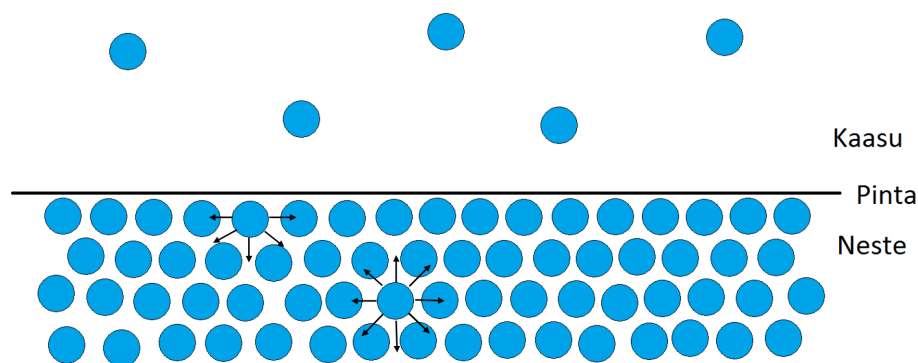
jotkut molekyylit muodostivat hyviä yksikerroskalvoja ja toiset eivät. Langmuir sai pintakemian tutkimuksestaan kemian Nobel-palkinnon vuonna 1932. [2]

Katharine Blodgett (1898–1979) aloitti Langmuirin opastuksessa ja auttoi häntä tutkimuksen kokeellisissa osissa. Myöhemmin hän kehitti yksikerroksisten rasvahapojen siirtotekniikkaa veden pinnalta kiinteille alustoille kuten lasilevyille. Tämän takia kiinteille substraateille siirrettyjä kalvoja kutsutaankin Langmuir-Blodgett-kalvoiksi. [2]

2.1 Pintakemiaa

Nesteessä molekyyleillä on jossain määrin vuorovaikutuksia toistensa kanssa [4]. Pinnassa olevan molekyylin ympärillä on vähemmän molekyylejä kuin nesteen keskellä olevalla molekyylillä [11]. Koska naapureita kaasufaasissa on niukasti, pinnassa olevaan molekyylin vaikuttava voima on epäsymmetrinen [3], jolloin kaasu- ja nestefaasin rajapinnassa olevaan molekyyliin kohdistuu voima nestefaasia kohti [4]. Koska kaikkiin muihinkin pinnassa oleviin molekyyleihin kohdistuu vastaava voima, millä tahansa pinnassa olevalla molekyylillä on taipumus siirtyä nesteen keskelle [3]. Tästä seuraa kokonaisvoima kohti nesteen keskustaa, mikä aiheuttaa sen, että kaasu- ja nestefaasin välinen rajapinta kutistuu spontaanisti mahdollisimman pieneksi [4].

Keskellä nestettä olevalla molekyylillä on vuorovaikutusvoimia tasaisesti kaikkiin suuntiin [4]. Ne ovat tasapainossa [4], eli toisin sanoen ei ole kokonaisvoimaa, joka vetäisi niitä johonkin suuntaan [3]. Kuvassa 2.1 on havainnollistettu nesteen sisällä ja pinnassa oleviin molekyyleihin kohdistuvia vuorovaikutusvoimia.



Kuva 2.1 Molekyyliden väliset vuorovaikutusvoimat nesteessä ja rajapinnassa. Nesteen sisällä oleviin molekyyleihin vaikuttavat voimat ovat symmetriset, mutta rajapinnassa oleviin molekyyleihin vaikuttaa kokonaisvoima kohti nesteen keskustaa.

Pinnan molekyyliin vaikuttavaa pitkittäistä voimaa kutsutaan pintajännitykseksi (γ) [11]. Poolisilla nesteillä, kuten vedellä, on vahvat molekyylien väliset vuorovaikutusvoimat, minkä takia niillä on suuri pintajännitys [4]. Pintajännitys pysyy vakiona, jos lämpötila on vakio, mutta laskee lämpötilan noustessa [11]. Pintajännityksen SI-yksikkö on N/m [3], koska energian yksikkö on J eli Nm ja pinta-alan yksikkö m² [4]. Niinpä voidaan sanoa, että pintajännitys on voima, jolla pintaan piirrettyä kuvitteellista viivaa vedetään pituusyksikköä kohden [3]. Yleisemmin käytetään yksikköä mN/m, koska se on paremmin nesteiden pintajännitysten suuruusluokkaa.

Nestepinnan päällä oleva yksikerroksinen kalvo vaikuttaa nesteen pintajännitykseen [11]. Kalvon aiheuttaman pintajännityksen muutoksen ajatellaan olevan painetta vastaava suure kahdessa ulottuvuudessa, joten sitä kutsutaan pintapaineeksi ja merkitään kreikkalaisella suuraakkosella pii (Π) [2]. Yksikerrostutkimuksessa pintapaineen mittausta käytetään paljon [11]. Pintapaine määritellään pinnalla olevan kalvon aiheuttamana pintajännityksen vähenemisenä puhtaan nesteen pintajännitykseen verrattuna [4], eli

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.1)$$

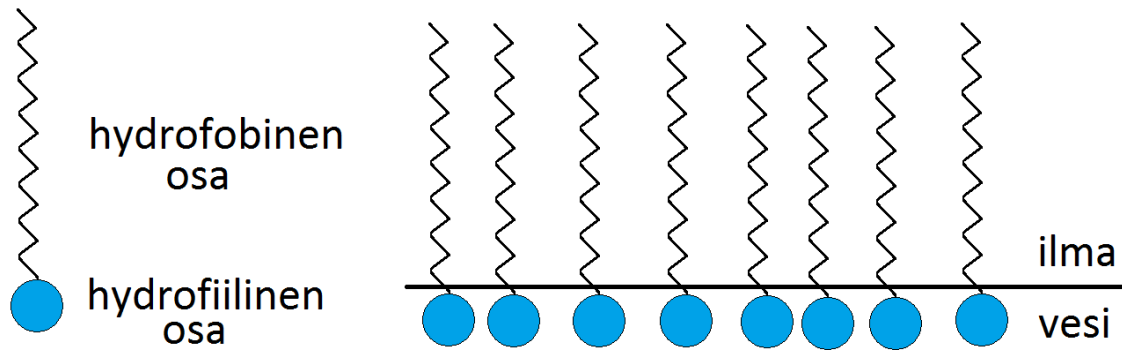
jossa γ_0 on puhtaan nesteen pintajännitys ja γ on kalvon peittämän pinnan pintajännitys [11]. Tämän vuoksi yksikerroksen pintapaine veden pinnalla ei voi olla suurempi kuin puhtaan nesteen pintajännitys, ja yleensä mitattavat arvot ovatkin paljon pienempiä [2].

2.2 LB- ja LS-menetelmien toimintaperiaate

Useimmat yksikerroksia muodostavat molekyylit koostuvat kahdesta osasta, joista toinen olisi sellaisenaan vesiliukoinen ja toinen ei [11]. Hydrofilinen (vesihakuinen) pää liukenee hyvin veteen ja hydrofobinen (vesipakoinen) häntä poolittomiin liuotimiin [4]. Tällaisia molekyyliä kutsutaan amfifiileiksi [11]. Amfifiilien järjestäytyminen yksikerrokseksi on esitetty kuvassa 2.2.

Kaikki amfifiiliset molekyylit ovat potentiaalisia pinta-aktiivisia aineita ja olennaisilta osiltaan yksikerroksia muodostavia materiaaleja [4]. Pinta-aktiivisia aineita kutsutaan myös surfaktanteiksi lyhennyksenä englanninkielisestä termistä 'surface active agents' [3]. Nimensä mukaisesti pinta-aktiiviset aineet sijoittuvat ilma-vesirajapintaan [4] siten, että niiden hydrofilinen pää on vedessä ja hydrofobinen häntä ilmassa [3].

Pinta-aktiiviset aineet jaetaan neljään ryhmään niiden hydrofilisen pään ionisen luonteen perusteella: anionisiin, kationisiin, ei-ionisiin ja kahtaisionisiin [3]. Kahtais-



Kuva 2.2 Amfifilisten molekyylien järjestäytyminen ilma-vesi-rajapinnassa. Amfifilit järjestäytyvät ilma-vesi-rajapintaan siten, että niiden hydrofiilinen pää on vedessä ja hydrofobinen häntä osoittaa ylöspäin ilmassa.

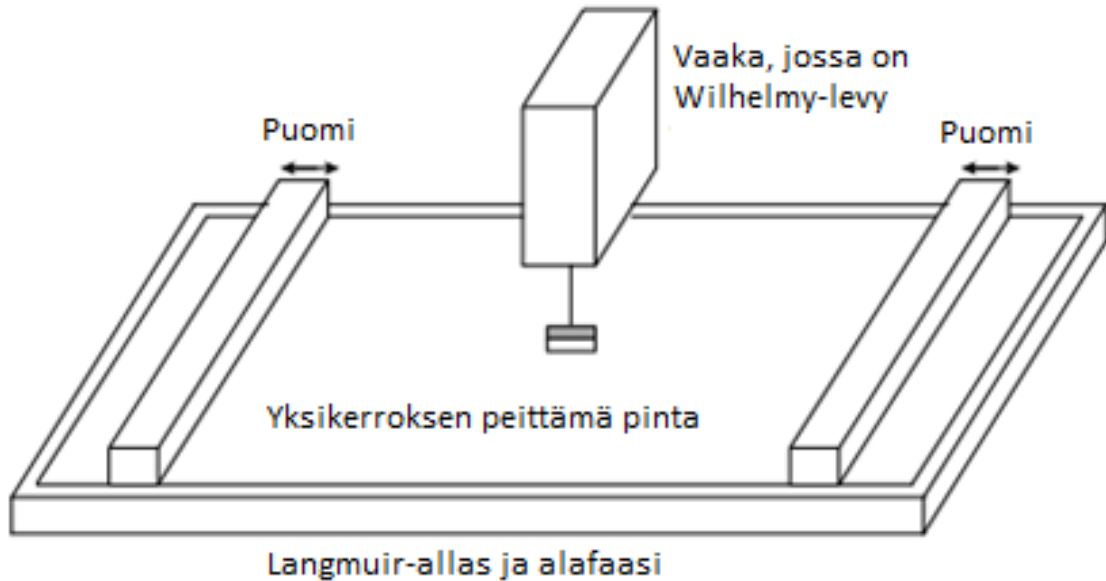
ioniset molekyylit, joilla on sekä positiivinen että negatiivinen varaus [11], jaetaan vielä kahteen ryhmään: niihin, joiden varaukseen liuoksen pH vaikuttaa, ja niihin, joihin se ei vaikuta [3].

Steariinihappo ($C_{17}H_{35}COOH$) on tyypillinen esimerkki pitkäketjuisesta rasvahaposta, joka muodostaa yksikerroksen veden pinnalle [2]. Yksikerroksia muodostavissa rasvahapoissa hiiliketjun on oltava tarpeeksi pitkä, jotta molekyyli ei liukene veteen [4]. Yleensä vähintään 12 hiiliatomin ketju riittää [11]. Jos ketju on lyhyempi, yhdiste on liian vesiliukoinen, eikä muodosta stabiilia yksikerrosta ilma-vesi-rajapintaan. Toisaalta jos hiiliketju on liian pitkä, amfifili kiteytyy veden pinnalle, eikä yksikerrosta muodostu. [4]

Myös ketjun päässä olevan ryhmän poolisuus vaikuttaa kalvon muodostukseen: jos pää ei ole riittävän poolinen, aine muodostaa pisaroita veden pinnalle, ja jos pää on liian poolinen, aine liukenee veteen turhan hyvin [11]. Optimaalista hiiliketjun pituutta onkin vaikea määrittää, koska kalvon muodostuminen riippuu myös amfifilin poolisesta osasta [4]. Kyse on tasapainosta, jossa jokainen muutos vaikuttaa yksikerroksen ominaisuuksiin [11].

2.2.1 Laitteisto

Langmuir-kalvojen kasvattamiseen on suunniteltu monenlaisia laitteita [11]. Laitteistoon, jota kutsutaan Langmuir-altaaksi, kuuluvat allas, puomit ja mikrovaaka pintajännityksen mittaamista varten [3]. Kaaviokuva tyypillisestä Langmuir-altaasta on esitetty kuvassa 2.3.



Kuva 2.3 Langmuir-altaaseen kuuluvat allas, puomit ja mikrovaaka pintajännityksen mittaamista varten [3]. Alafaasina käytetään yleensä vettä [2], ja yksikerros levitetään sen pinnalle. Wilhelmy-levy on suosituin pintapaineen mittaussuunnitelma [11]. Kuva on muokattu lähteestä [12].

Altaan materiaalin on oltava inertti ja sen pitäisi kestää orgaanisia liuottimia ja epäorgaanisia happoja. Allas ei saa vapauttaa epäpuhtauksia alafaasiin, ja jotta puhdistaminen olisi helppoa, altaan olisi hyvä olla hydrofobinen. Lisäksi olisi toivottavaa, että materiaalia olisi helppo muokata, jotta altaiden valmistaminen ei olisi kovin vaikeaa. [2] Nykyisin allas ja puomit valmistetaan useimmiten poly(tetrafluoroetyleenistä) eli PTFE:stä [3]. PTFE on hydrofobinen, oleofobinen ja sietää miltei kaikkia kemikaaleja. Valitettavasti materiaalissa on huokosia, jotka saattavat kerätä ja sitten hitaasti vapauttaa pinta-aktiivisia aineita. Niinpä erittäin huolellinen puhdistus on välttämätöntä kontaminaation välttämiseksi. [2]

Langmuir-altaat ovat yleensä vain muutaman millimetrin syvyisiä ja niissä on kaivo, jonka kohdalla altaaseen voidaan kastaa suurempia substraatteja [11]. Altaiden pinta-ala on tavallisesti $150\text{--}1000\text{ cm}^2$ ja alafaasin kokonaistilavuus $0,1\text{--}2\text{ l}$. Langmuir-altaat ovat useimmiten suorakulmaisia, mutta pyöreitäkin altaita on käytetty [11].

Veden pintajännitys on $72,8\text{ mN/m}$ normaalissa ilmanpaineessa ja 20 °C :een lämpötilassa. Se on poikkeuksellisen korkea useimpiin muihin nesteisiin verrattuna. [4] Se osaltaan selittää veden ylivoimaisuutta alafaasina [2]. Yksikerroskalvojen tutkimuksessa on kyllä käytetty useita eri alafaaseja, veden lisäksi esimerkiksi elohopeaa ja hiilivetyjä [11]. On myös yhdisteitä, joiden alafaasina kannattaa käyttää vettä, johon on lisätty hieman jotain muuta liuotinta, kuten glyserolia, etano-

lia, butanolia tai heksanolia. Nämä ovat kuitenkin poikkeuksia. [2] Suurin osa Langmuir-kalvoista on tehty käyttäen vettä alafaasina [3] ja lähes kaikissa tutkimuksissa, joissa kalvoja on siirretty alafaasin päältä substraatille, vesi on ollut alafaasina [11]. Veteen lisätään usein sopivaa suolaa, jolla se esimerkiksi puskuroidaan haluttuun pH-arvoon. Vesi on halpaa, sitä on saatavilla paljon ja sitä voidaan verrattain helposti puhdistaa myös suuria määriä. Onkin erittäin epätodennäköistä, että jokin muu aine korvaisi veden alafaasina yksikerrostutkimuksessa. [2]

Pintapaineen mittaamiseen on kaksi tyystin erilaista lähestymistapaa: Langmuir-vaaka ja Wilhelmy-levy [2]. Molempien tarkkuus on noin 10^{-3} mN/m, mutta Wilhelmy-levy on tekniikkana hieman suositumpi [11]. Langmuir-vaaka on differentiaalinen tekniikka, jossa alafaasi jaetaan väliseinällä yksikerroksen peittämään ja puhutaan osaan [2]. Väliseinänä on usein PTFE:stä valmistettu kelluke, joka on yhdistetty mikrovaakaan [11]. Vaa'alla mitataan voimaa, joka siirtää kelluketta alafaasin pinnalla [4]. Wilhelmy-levy-menetelmässä mitataan osittain alafaasiin upotettuun levyyn kohdistuvaa voimaa [2]. Ensin mitataan puhtaan pinnan arvo, johon yksikerrospinnan arvoa sitten verrataan [4]. Levyyn kohdistuva kokonaisvoima koostuu levyä alaspäin vetävistä painovoimasta ja pintajännityksestä sekä ylöspäin nostavasta syrjäytetyn veden aiheuttamasta nosteesta [11].

Wilhelmy-levyjä on valmistettu useista materiaaleista, joista yleisimpiä ovat karhennettu kiille, lasi ja platina [3]. Myös uutta, puhdasta suodatinpaperia on käytetty ja sen on havaittu tehokkaasti estävän kontaminaatiota aiemmista yksikerroksista [2]. Wilhelmy-levy-menetelmän suurin ongelma on, että pintapaineen mittaamiseksi Wilhelmy-levyn kontaktikulma on tiedettävä tarkasti [4]. Jos levy on täydellisesti kastunut, kontaktikulma on 0° [3]. Täydellinen kastuminen on yksinkertaista varmistaa mittauksen alussa, kun vastapuhdistettu levy upotetaan puhtaan nesteen pintaan [2]. Ongelma syntyy, jos yksikerrosmateriaalia siirtyy levyille, sillä se muuttaa kontaktikulmaa [4]. Ei ole myöskään tavatonta, että Wilhelmy-levy siirtyy sivuttaissuunnassa, kun yksikerrosta puristetaan. Sitä on kuitenkin mahdollista ehkäistä sijoittamalla Wilhelmy-levy altaan keskelle ja puristamalla kalvoa symmetrisesti altaan molemmista päistä. [2]

2.2.2 Puhtaus

Alafaasina käytettävän veden laatu on äärimmäisen tärkeää [2], ja sen on oltava mahdollisimman puhdasta [11]. Useimmissa yksikerroskokeissa pinta-aktiivista ainetta käytetään mikrogrammoja, mutta alafaasin tilavuus saattaa olla useita litroja. Niinpä miljardisosan eli ppb-pitoisuuden epäpuhtaudet alafaasissa saattavat aiheuttaa ongelmia, jos ne ovat pinta-aktiivisia. [2] Alafaasina on käytetty sekä tislattua

että deionisoitua vettä [11], mutta nykyään käytetään yleensä ultrapuhdasta vettä eli milli-Q-vettä. Kun vesi on puhdistettu, sitä on käsiteltävä huolellisesti, jotta se säilyy hyvänä [2]. Ollessaan tekemisissä ilman kanssa vesi absorboi hiilidioksidia, jolloin sen pH laskee [11].

Ilmasta tulevia epäpuhtauksia on vaikea täysin välttää [2]. Varotoimenpiteet, kuten yksinkertaiset suojukset tai kotelot altaan päällä ovat suositeltavia [11]. Alafaasin läheisyydessä olevien partikkeleiden määrä vähenee huomattavasti, kun altaan sijoittaa puhdistilaan. Ne ovat kuitenkin kalliita ja saattavat olla tarpeettomia joissain mittauksissa. [11] Myös altaan käyttäjästä peräisin olevat pienhiukkaset on syytä ottaa huomioon. Laboratoriotakin, hatun, hansikkaiden ja hengityssuojaimen käyttö on suositeltavaa. [11] Vaihtoehtoisesti alafaasin pinnan puhdistus ja yksikerroksen levittäminen voidaan automatisoida täysin [2].

Alafaasin pinnan puhdistus ennen yksikerroksen levittämistä on välttämätön osa hyvälaatuisten LB- ja LS-kalvojen valmistusta [11]. Yhden puomin altaissa pinnan voi puhdistaa vetämällä puomin pinnan yli [2]. Kahden puomin altaissa tavallinen menettelytapa on ensin pienentää pinta-ala niin pieneksi kuin mahdollista ja sitten puhdistaa se sopivaan pumppuun yhdistetyllä lasikapillaariputkella [11]. Puhdistuksen saattaa joutua toistamaan useita kertoja ennen kuin pinta on tarpeeksi puhdas [2]. Puhdistuksen onnistumisen voi selvittää mittaamalla pintapainetta samalla kun alaa pienennetään [11]. Lopuksi on tarkistettava, että alafaasin pinta on sopivalla tasolla [2].

Useimmat yksikerrosmateriaalit levitetään alafaasin pinnalle liuottamalla ne ensin sopivaan liuottimeen [11] ja pisaroimalla liuosta sitten alafaasin pinnalle mikrolitruuskusta [2]. Jos liuos pisaroidaan lähelle alafaasin pinnan keskikohtaa, mahdolliset kontaminaatiota aiheuttavat aineet siirtyvät samalla kalvon reunoille pois alueelta, jolta kasvatus tehdään [11]. Kohdatessaan veden pinnan liuotin nopeasti leviää peittämään koko käytettävissä olevan pinnan. Kun liuotin sitten haihtuu, pintaan on muodostunut yhden molekyylin paksuinen kerros, jossa molekyylien päät ovat uponneina veteen ja hännät ovat veden pinnan yläpuolella. [4]

Tyypillisesti yksikerroksen pipetointiin on käytetty n-heksaania (kiehumispiste 69 °C) ja kloroformia (kp 61 °C) [2]. Käytettävän liuottimen on liuotettava riittävän suuri määrä yksikerrosmateriaalia, eikä se saa reagoida kemiallisesti materiaalin kanssa saati liueta alafaasiin, ja lisäksi sen on haihduttava järkevässä ajassa siten, ettei siitä jää jäämiä alafaasin pinnalle [11]. Koska käytetty liuotin haihtuu laboratorion ilmaan, liuottimen myrkyllisyyteen ja asianmukaiseen kohdepoistoon altaan läheisyydessä on kiinnitettävä huomiota [2].

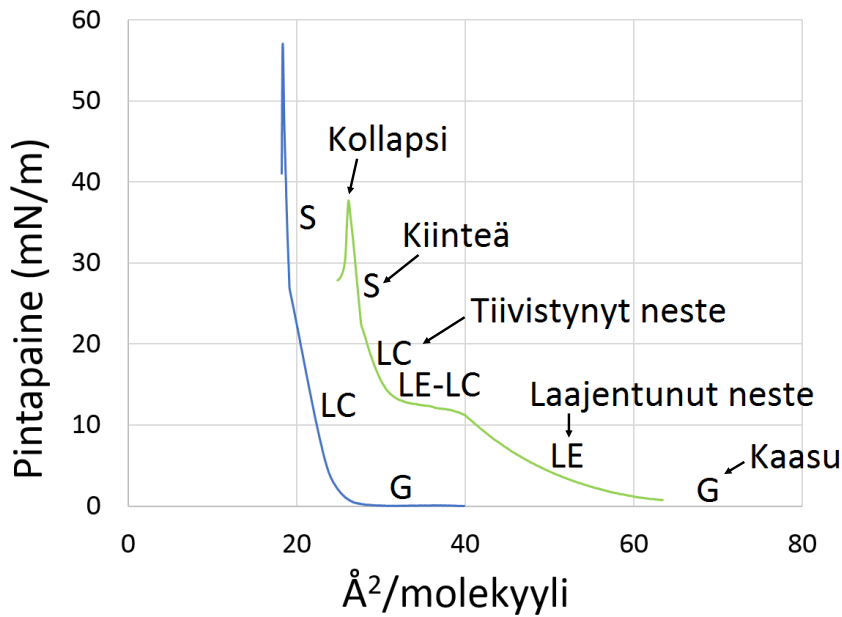
2.2.3 Π -A-isotermi

Yksikerroksen faasikäyttäytyminen määräytyy pääasiassa amfifilin fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien perusteella [4]. Nämä perustavaa laatua olevat kokeelliset tulokset esitetään yleensä pintapaineena molekyylin pinta-alaa kohti [3]. Se saadaan, kun kalvon pinta-ala A jaetaan veden pinnalla olevien molekyyliden kokonaismäärällä [11]. Näin saadaan kaava

$$mma = \frac{A}{N_M} \quad (2.2)$$

jossa N_M on molekyyliden kokonaismäärä [3] ja mma molekyylin keskipinta-ala (mean molecular area).

Kuvaaja tunnetaan pintapaine/pinta-ala-isoterminä, ja se lyhennetään usein isotermiksi [2]. Isotermi mitataan vakio-lämpötilassa ja useimmiten pseudotasapaino-olosuhteissa, joissa yksikerrosta puristetaan tasaisesti samalla, kun pintapainetta mitataan [4]. Kuvassa 2.4 on esimerkki kahdesta tyypillisestä isotermistä.

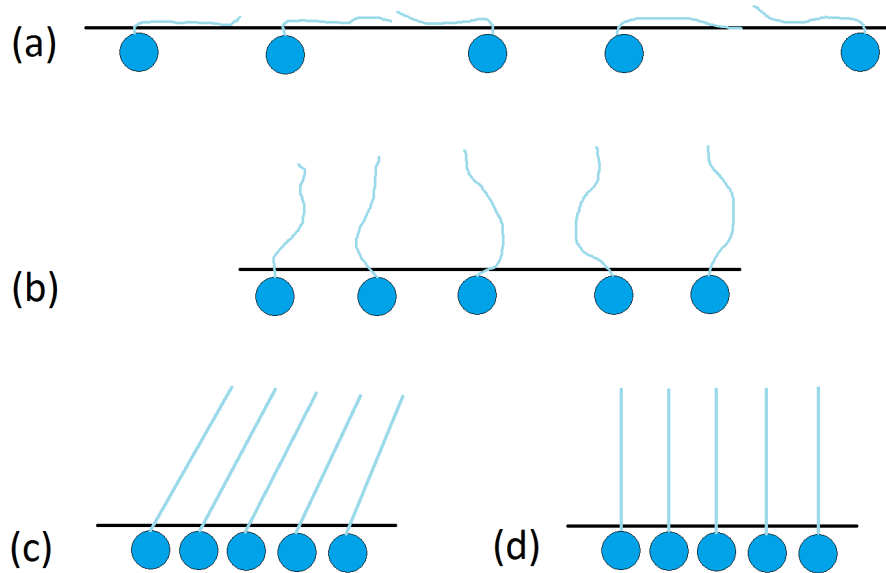


Kuva 2.4 Pitkäketjuiselle rasvahapolle ja fosfolipidille tyypilliset π -A-isotermi ja niissä havaittavat faasimuutokset.

Isotermistä löytyy useita selkeästi havaittavia alueita [2]. Sen muodoista on mahdollista tunnistaa yksikerroksen neljä pääfaasia: kaasu (G, gas), laajentunut neste (LE, liquid-expanded), tiivistynyt neste (LC, liquid-condensed) ja kiinteä (S, solid) [3].

Molekyylien käyttäytymistä G-faasissa voidaan selittää samoin kuin kaasun käyttäytymistä ilmassa ja vastaavasti molekyylit S-faasissa käyttäytyvät kiinteän aineen tavoin. Niinpä on houkuttelevaa kutsua väliin jäävää faasia nestefaasiksi. [2] Nestetermin käyttö LE- ja LC-faasien nimissä on kuitenkin vain historiallinen jäännös, joka johtuu sittemmin kumotusta olettamuksesta, että molekyylit käyttäytyisivät alafaasin pinnalla nesteen tavoin [11]. Kuvaan 2.4 on hahmoteltu pitkäketjuisen rasvahapon ja fosfolipidin isotermit ja niissä näkyvät faasit.

G-faasissa molekyylit ovat toisistaan niin kaukana, että ne eivät juuri kohdistaväluorovaikutusvoimia toisiinsa [11], vaan liikkuvat itsenäisesti kaksiuulotteisen kaasun tapaan [3]. Niinpä molekyyleillä G-faasissa on paljon vapausasteita [4]. Kuvassa 2.5(a) on esitetty molekyylien käyttäytyminen G-faasissa. Molekyylien ollessa G-faasissa pintapaine on yleensä hyvin pieni ($< 1 \text{ mN/m}$), joten G-faasi ei useinkaan erotu isotermitä [2].



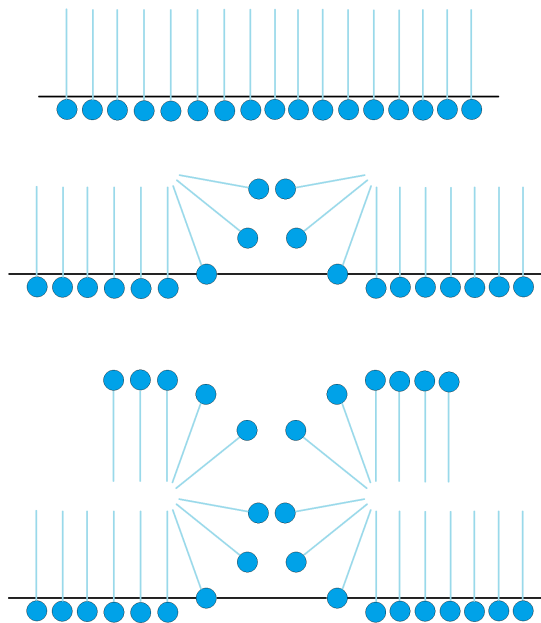
Kuva 2.5 Rasvahappo- ja fosfolipidimolekyylien järjestäytyminen Langmuir-kalvolla isotermin eri vaiheissa: (a) G-faasissa molekyylit ovat toisistaan niin kaukana, etteivät ne juuri kohdistaväluorovaikutusvoimia toisiinsa [11]. (b) LE-faasissa hiiliketjut vuorovaikuttavat toistensa kanssa [11], mutta eivät ole vielä järjestäytyneet säännölliseksi rakenteeksi [3]. (c) LC-faasissa molekyylit ovat pakkautuneet tiiviisti ja hiiliketjut ovat järjestäytyneet [3]. (d) S-faasissa hiiliketjut ovat tiiviisti pystysuorassa [3].

Nesteen pinta-alaa pienennettäessä hiiliketjut alkavat vuorovaikuttaa toistensa kanssa [11]. Yksikerroksesta tulee yhtenäinen, mutta molekyyleillä on silti vapausasteita [4], eivätkä hiiliketjut ole järjestäytyneet säännölliseksi rakenteeksi [3]. Tämä näkyy myös kuvassa 2.5(b). LE-faasissa pinta-ala molekyyliä kohti vaihtelee huomattavasti

pintapaineen mukaan, eikä sen perusteella voi tehdä päätelmiä molekyylien mitta-suhteista [4].

LC- ja S-faaseja kutsutaan tiivistyneiksi faaseiksi [11]. Niissä molekyylit ovat pakkautuneet tiiviisti ja hiiliketjut ovat yhdenmukaisesti suuntautuneet [4]. Se on kuvattu myös kuvassa 2.5. LC-faasissa hiiliketjut ovat järjestäytyneet, mutta eivät vielä suoristuneet pystyyn kuten S-faasissa. Käytössä on myös malli, jossa LC-faasin hiiliketjut esitetään epäjärjestäytyneinä, kuin nesteenä. [3]

Kuten myös kuvasta 2.4 nähdään, käytettävissä olevan kapean pintapaine- ja lämpötila-alueen takia kaikki faasit eivät näy kaikkien yksikerrosten isotermeissä [3]. II-A-isotermistä saadaan tietoa yksikerroksen stabiilisuudesta rajapinnalla, molekyylien uudelleenjärjestäytymisestä ja faasimuutoksista, mutta yksikerroksen ominaisuuksien lisäksi isotermin muotoon vaikuttavat myös kokeelliset olosuhteet, kuten lämpötila, pH ja alafaasin koostumus [4].



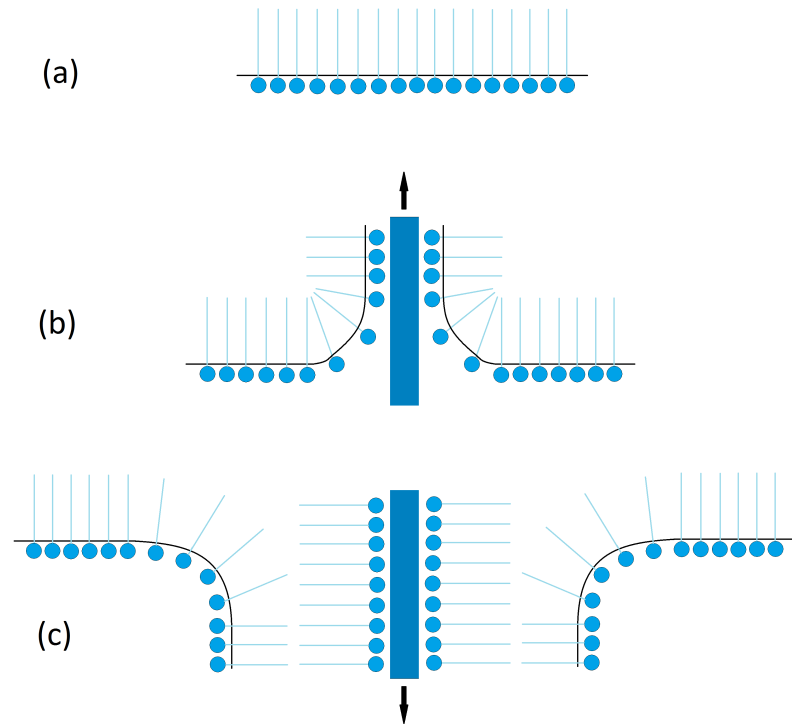
Kuva 2.6 Kun tiiviisti järjestäytynyttä yksikerrosta edelleen puristetaan, molekyylikerrokset nousevat toistensa päälle ja muodostavat epäjärjestyksellisiä monikerroksia. Sanotaan, että kalvo menee kollapsiin.

Kun yksikerrosta puristetaan edelleen, pintapaine kasvaa ja pinta-ala pienenee, kunnes pintapaineen kasvattaminen ei ole enää mahdollista [11]. Molekyylit ovat saavuttaneet keskipinta-alan raja-arvon eli pienimmän keskipinta-alan, jossa ne voivat olla yksikerroksena. Kuvassa 2.6 on havainnollistettu tällaista tilannetta. Molekyylit eivät pysy enää yksikerroksena alafaasin pinnalla, jolloin sanotaan, että kalvo on mennyt kollapsiin [3], ja kalvon puristettavuus kasvaa äärettömästi [2]. Uskotaan,

että kollapsissa molekyylikerrokset nousevat toistensa päälle, jolloin muodostuu epäjärjestyksellisiä monikerroksia [2]. Pintapaine, jossa kalvo menee kollapsiin, on kullekin aineelle ominainen suure, mutta riippuu silti monista tekijöistä, kuten yksikerroksen puristusnopeudesta ja kalvon historiasta [11], [2], [4].

2.2.4 LB-kalvon kasvatus

Kun kalvo on puristettu alafaasin pinnalla haluttuun pintapaineeseen, kalvon kasvatus kiinteän substraatin pinnalle voidaan aloittaa. Substraatin laadusta riippuen ensimmäinen yksikerros siirtyy substraatin pinnalle joko kun substraatti nostetaan tai kun se lasketaan alafaasin pinnalla olevan kalvon läpi [4]. Yksikerroskalvon siirto alafaasin pinnalta substraatille on esitetty kuvassa 2.7. Jos substraatin pinta



Kuva 2.7 Kuvasarjassa (a)-(c) on esitetty Y-tyyppin mukainen yksikerroksen kasvatus substraatille. (a) Yksikerros on puristettu haluttuun pintapaineeseen. (b) LB-kalvo siirtyy substraatin pinnalle, kun hydrofiilinen substraatti nostetaan yksikerroksen läpi. (c) Toisella kastamiskerralla substraatin pinnalla olevat hydrofobiset hännät vuorovaikuttavat alafaasin pinnalla olevien molekyylien hydrofobisten häntien kanssa ja substraatille siirtyy toinen kerros.

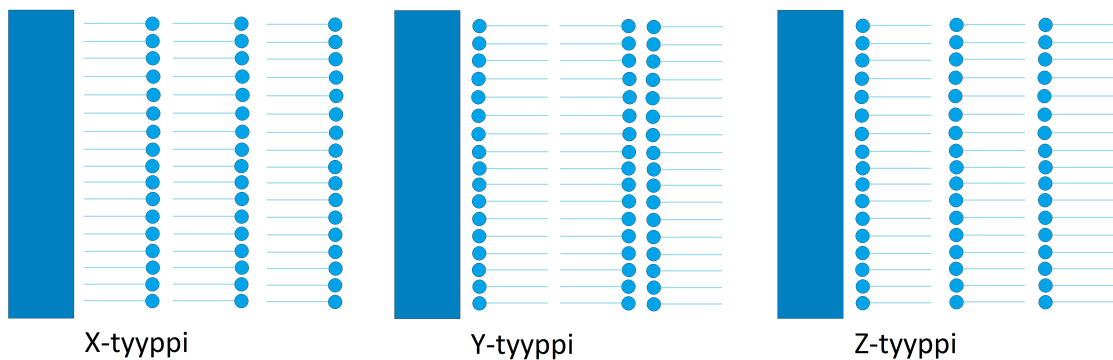
on hydrofobinen, yksikerros siirtyy substraatille hydrofobisten häntien vuorovaikutuksessa sen kanssa, kun substraattia lasketaan alafaasiin. [4] Tavallisempaa kuitenkin on, että kalvo siirtyy substraatin pinnalle, kun hydrofiilinen substraatti nostetaan

yksikerroksen läpi. Tällöin amfifilien hydrofiliset päät tarttuvat substraattiin, ja kalvo siirtyy alafaasin pinnalta substraatille. [11] Tämä vaihe on esitetty kuvassa 2.7(b). Substraatti voidaan laittaa alafaasiin odottamaan jo ennen yksikerroskalvon levittämistä [4].

Kun substraatti kastetaan alafaasiin toisen kerran, jo siirretyn kalvon hydrofobiset hännät ovat substraatin pinnalla, jossa ne vuorovaikuttavat ilma-vesi-rajapinnalla olevien molekyylien hydrofobisten häntien kanssa [4]. Niinpä kun substraatti laske-
taan alafaasiin, toinen kerros muodostuu substraatin pinnalle eri päin kuin edellinen. Tätä on havainnollistettu kuvassa 2.7(c).

Toista kertaa substraattia nostettaessa hydrofiliselle pinnalle tarttuvat molekyylien hydrofiliset päät [4]. Tällä tavoin muodostuvaa kalvoa, jossa kerros muodostuu aina, kun substraatti liikkuu faasirajan läpi, kutsutaan Y-tyyppin kalvoksi [2]. Se on yleisin lopputulos LB-menetelmän käytöstä amfifilisillä molekyyileillä, joiden pää on hydrofiilinen ja häntä hydrofobinen hiilivetyketju [4]. Tämä selittyy sillä, että molekyylien väliset vuorovaikutusvoimat ovat voimakkaimmat, kun hydrofobiset hännät ovat muita hydrofobisia häntiä vasten ja hydrofiliset päät kohti muita hydrofilisiä päitä [2].

Y-tyyppin lisäksi kasvatustyypppejä ovat X- ja Z-tyyppi [3]. Nämä tyypit on esitetty kuvassa 2.8. X-tyyppin kasvatuksessa yksikerros siirtyy alafaasin pinnalta substraatille vain substraattia alafaasiin laskettaessa ja Z-tyyppin kasvatuksessa substraattia nostettaessa [4]. Vaikka Y-tyyppi on yleisin, myös X- ja Z-tyyppin kasvatuksia nähdään usein [11].



Kuva 2.8 LB-kalvojen eri tyypit: Y-tyyppin kalvo muodostuu, kun yksikerros siirtyy substraatin pinnalle aina, kun substraatti viedään ilma-vesi-rajapinnan läpi. X-tyyppin kasvatuksessa kalvo siirtyy vain substraattia alafaasiin laskettaessa ja Z-tyyppin kasvatuksessa substraattia alafaasista nostettaessa. Y-tyyppin kasvatusta on yleisin, sillä siinä molekyylien hydrofiliset päät vuorovaikuttavat keskenään ja hydrofobiset hännät keskenään.

Siirron tyyppi riippuu yksikerroksen luonteesta, substraatista, alafaasista ja pintapaineesta [2]. On myös mahdollista, että tyyppi vaihtuu kasvatuksen aikana tai on jo alunperin kahden tyypin yhdistelmä [11].

On kuitenkin syytä huomata, että kuvassa 2.8 esitetyt X-, Y- ja Z-tyypin rakenteet ovat hahmotelmia, jotka eivät välttämättä kuvaa molekyylien todellista järjestäytymistä substraatin pinnalle [4]. X-, Y- ja Z-tyyppi kuvaavatkin molekyylien käyttäytymistä siirron aikana, eivät muodostuvan kalvon rakennetta [3]. On mahdollista, että molekyylit järjestäytyvät uudelleen joko kasvatuksen aikana tai pian sen jälkeen [4].

Kalvonmuodostuksessa yksi tärkeimmistä muuttujista on nopeus, jolla substraatti liikkuu yksikerros-rajapinnan läpi [2]. Substraatti voidaan laskea alafaasiin melko nopeasti ilman, että se heikentää yksikerroksen siirtoa [11]. On kuitenkin tärkeää, ettei substraattia nosteta liian nopeasti, jotta vesi ehtii valua pois [4]. Veden poistuminen ei johdu painovoimasta, vaan se on seurausta siirretyn yksikerroksen ja substraattimateriaalin välisestä adheesiosta [2].

Ensimmäisen yksikerroksen siirrossa nopeus on tyypillisesti hyvin hidas, noin 10 mikrometrinä sekunnissa muutamiin millimetreihin sekunnissa [11]. Seuraavien kerrosten siirtämisessä voidaan käyttää huomattavasti suurempia nopeuksia, jopa useita senttimetrejä sekunnissa [4]. Jotta siirretyistä kalvoista tulisi mahdollisimman hyviä, usein kannattaa odottaa, että edellinen kerros on täysin kuivunut, ennen kuin jatkaa seuraavaan kastamiskierrokseen [11].

Kun LB-kalvoja kasvatetaan kiinteän substraatin pinnalle, on tärkeää paitsi mitata yksikerroksen pintapainetta, myös pystyä kontrolloimaan sitä [2]. Ensin pintapaine ja lämpötila säädetään siten, että yksikerroskalvo on stabiili ja sopivan tiivis [11]. Pintapaineen on oltava riittävän korkea, jotta yksikerros ei hajoa kasvatuksen aikana [4].

Parhaan tuloksen antava pintapaineen arvo riippuu yksikerroksen luonteesta ja se on selvitettävä kokeellisesti [2]. Usein käytetään kuitenkin pintapainetta 20 mN/m ja 40 mN/m:n väliltä [3], sillä materiaaleja voidaan harvoin kasvattaa onnistuneesti alle 10 mN/m:n pintapaineessa ja yli 40 mN/m:n pintapaineessa kollapsi ja kalvon jäykkyys aiheuttavat usein ongelmia [2].

Molekyylien järjestäytyminen kasvatetussa LB-kalvossa riippuu vahvasti kasvatusolosuhteista [11]. Hyvälaatuisen kalvon kasvattamiseksi on ehdottoman tärkeää, että siirtonopeus ja yksikerroskalvon pintapaine ovat sopivat. Oikea nopeus varmistaa, että kalvo tarttuu hyvin substraattiin, ja tarkoituksenmukainen pintapaine tekee

kalvosta homogeenisen. [4] Jo pienet muutokset olosuhteissa, esimerkiksi epäpuhtaudet, lämpötilan muutos tai värinä, voivat vaikuttaa merkittävästi kasvatusprosessiin [4].

Yksikerroksen kasvatuksen onnistumisen mittarina käytetään usein siirtosuhdetta (τ) [2]. Siirtosuhte määritellään alafaasin pinnalla olevan yksikerroksen varaa-man pinta-alan vähenemisen ja päällystetyn substraatin pinta-alan osamääränä [4]. Voidaan siis kirjoittaa

$$\tau = \frac{A_L}{A_S} \quad (2.3)$$

missä A_L on yksikerroksen pinta-alan pieneneminen alafaasin pinnalla ja A_S on päällystetyn substraatin pinta-ala [11].

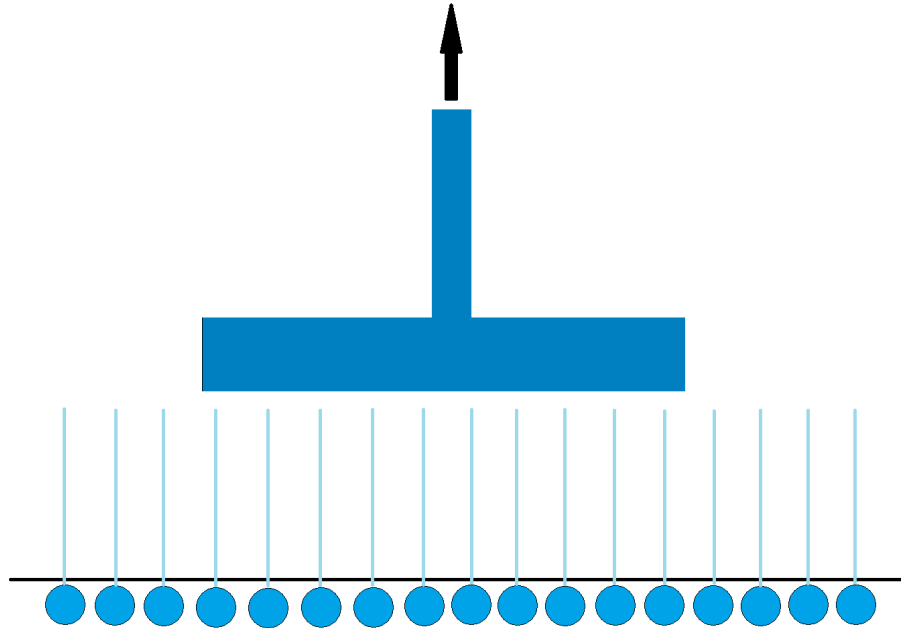
Koska yksikerroksen pintapaine on pidettävä vakiona kasvatuksen ajan, sen pinta-alan muutos saadaan helposti selville pintapainetta säätelevästä sähköisestä järjestelmästä [2]. Puomien liikkuminen kasvatuksen aikana kertoo, paljonko kalvon pinta-ala on pienentynyt [4].

Sopivilla materiaaleilla siirtosuhteen arvoksi saadaan usein yksi [3] ja useimmissa olosuhteissa sitä pidetään onnistuneen kasvatuksen merkinä [2]. Siirtosuhte, joka on välin 0,8–1,2 [4] tai merkittävästi välin 0,95–1,05 [11] ulkopuolella, viittaa siirretyn kalvon epähomogeenisuuteen. Vaihteleva siirtosuhte on lähes aina merkki epätydyttävästä kalvon siirrosta [2]. Nämä raja-arvot pätevät kuitenkin vain rasvahapoille ja muille pinta-aktiivisille aineille, joten niiden hyödyntäminen tässä työssä on varsin rajallista.

2.2.5 LS-kalvon kasvatusta

Oleellisin ero LB- ja LS-kalvon kasvatuksessa on substraatin asento. LB-kasvatuksessa substraattilevy liikkuu pystysuorassa yksikerroskalvon läpi, kun taas LS-kasvatuksessa kalvo kasvatetaan vaakasuorassa olevalle substraatille. Substraatti lasketaan alafaasin pintaan siten, että se koskettaa alafaasin pinnalla olevaa kalvoa, ja nostetaan sitten takaisin ylös. Kuvassa 2.9 on havainnollistettu LS-kasvatusta.

LS-tekniikan etuna LB-tekniikkaan verrattuna on, että kalvoja voidaan kasvattaa myös sellaisille substraateille, joiden toisen puolen on pysyttävä puhtaana, esimerkiksi erilaisille sensoreille [1]. LS- ja LB-menetelmien välillä ei kuitenkaan aina tehdä eroa, vaan osa tutkijoista puhuu myös Langmuir-Schaeffer-menetelmällä valmistetuista



Kuva 2.9 LS-kalvon kasvatus. Substraatti lasketaan koskettamaan alafaasin pinnalla olevaa kalvoa ja nostetaan sitten ylös, jolloin kalvo jää substraatin pinnalle.

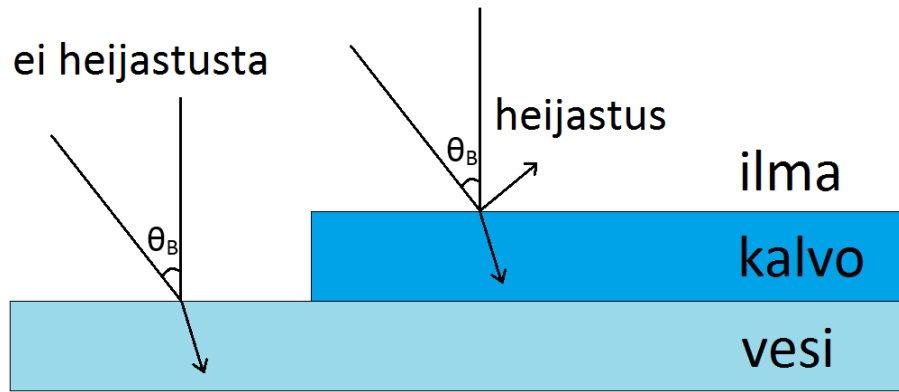
kalvoista Langmuir-Blodgett-kalvoina [13].

2.3 Kalvojen kuvaaminen isotermin puristamisen aikana

Brewsterin kulma -mikroskooppia (Brewster Angle Microscopy, BAM) käytetään laajalti erityisesti ohutkalvotutkimuksessa. BAM-tekniikka kehitettiin juuri ilma-vesi-rajapinnassa olevien yksikerroskalvojen, joiden paksuus on noin 2 nm, tutkimista varten. BAM on halpa menetelmä pinnan tutkimiseen ja sen etuna on, ettei se vaikuta tutkittavaan kohteeseen mitenkään: pintaan ei tarvitse koskea, siihen ei tule epäpuhtauksia eikä mitattavaan kalvoon tarvitse mittausta varten lisätä mitään. Niinpä sitä voidaan käyttää ohutkalvojen tarkkailemiseen, kun ne muodostuvat ilma-vesi-rajapinnassa. [14]

BAM perustuu Brewsterin kulmaan, jossa lineaarisesti tasopolarisoitu valo ei heijastu lainkaan ilma-vesi-rajapinnasta [14]. Kun veden pinnalle levitetään kalvo, pinnan taitekerroin muuttuu, mikä havaitaan heijastuksena [3]. Ilmiötä on havainnollistettu kuvassa 2.10. Heijastuneen valon avulla voidaan muodostaa kuvia [14].

Ennen yksikerroksen levittämistä alafaasin pinnalle tasopolarisoitu valonsäde säädetään Brewsterin kulmaan siten, että heijastusta ei tapahdu. Tällöin kuvan tausta saadaan täysin mustaksi. Kalvon levittämisen jälkeen tapahtuva heikko heijastus nähdään silloin kuvassa. [14] Mitä kirkkaampi kohta kuvassa on, sitä tiheämpi tai



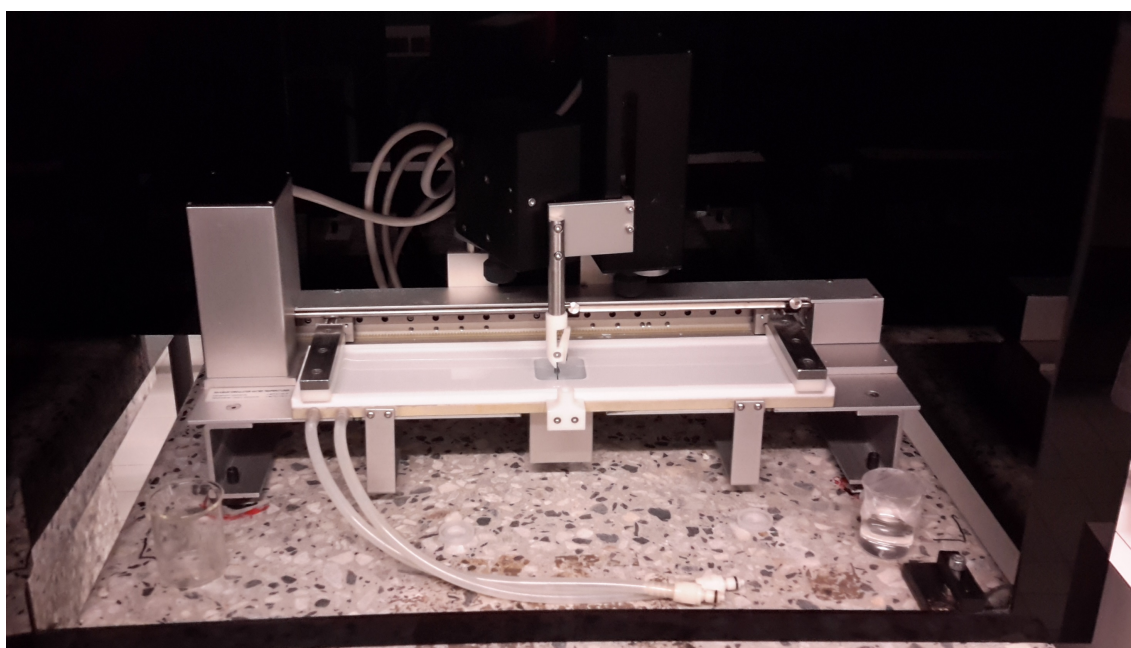
Kuva 2.10 Brewsterin kulma. Tasopolarisoitu valonsäde säädetään Brewsterin kulmaan θ_B , jolloin heijastusta ei tapahdu. Kun pinnalle levitetään yksikerroskalvo, heijastus havaitaan.

paksumpi kalvo sillä kohtaa on.

2.4 LB- ja LS-menetelmien käyttötarkoitus

Molekyylien koosta ja niiden välisistä vuorovaikutuksista saadaan paljon hyödyllistä tietoa tutkimalla veden pinnalla olevia yksikerroksia, mutta erityisen kiinnostavaa on, että kalvot voidaan siirtää kiinteän substraatin pinnalle Langmuir-Blodgett (LB) -tekniikaksi kutsutulla menetelmällä [2]. Langmuir-Schaeffer (LS) -tekniikka on LB-tekniikan variaatio. LB- ja LS-tekniikoiden suurin etu on, että molekyylit järjestäytyvät täydellisesti veden pinnalla ja järjestys voidaan säilyttää, kun kalvo siirretään kiinteälle substraatille, kunhan olosuhteet säädetään sopiviksi [4]. Kalvon molekyylien erittäin tarkka järjestäytyminen onkin yksi päänäkökohdista mahdollisia sovelluksia mietittäessä [3]. Valokuva Langmuir-altaasta on kuvassa 2.11.

LB- ja LS-tekniikat ovat erityisen houkuttelevia, sillä ne mahdollistavat kalvon paksuuden ja molekyylien järjestäytymisen tarkan kontrolloinnin lisäksi myös homogeenisen kalvonmuodostuksen molekyylin kokoon verrattuna laajoille substraattipinnoille ja mahdollisuuden siirtää yksikerroksia melkein millaiselle tahansa kiinteälle substraatille [4]. Yleensä substraatti valitaankin kalvon lopullisen käyttötarkoituksen mukaan: AFM-mittauksia varten substraatiksi valitaan kiille, röntgen-diffraktiota varten pii ja optisiin tutkimuksiin kvartsi [3].



Kuva 2.11 Kalvojen kasvatukseen käytetty KSV Minitrough -systeemi oli puhdastilassa mustan suojuksen alla, jotta kontaminaatio olisi mahdollisimman vähäistä. Suojakotelo näkyy kuvan reunoilla. Keskellä Langmuir-allasta näkyy muuta allasta huomattavasti syvempi kaivo, jota tarvitaan LB-kasvatuksessa. Pöytä vähentää laitteeseen kohdistuvaa tärinää. ©Elina Vuorimaa-Laukkanen

3. NANOSELLULOOSA

Selluloosa on maailman runsaimmin esiintyvä uusiutuva materiaali [15], [16], [17]. On arvioitu, että sitä tuotetaan joka vuosi melkein 700 miljardia tonnia [17]. Selluloosaa on käytetty lähes 150 vuotta monenlaisten päivittäisessä käytössä olevien tuotteiden raakamateriaalina [16] ja nykyisin jatkuvassa käytössä on lukuisia selluloosan sovelluksia [17].

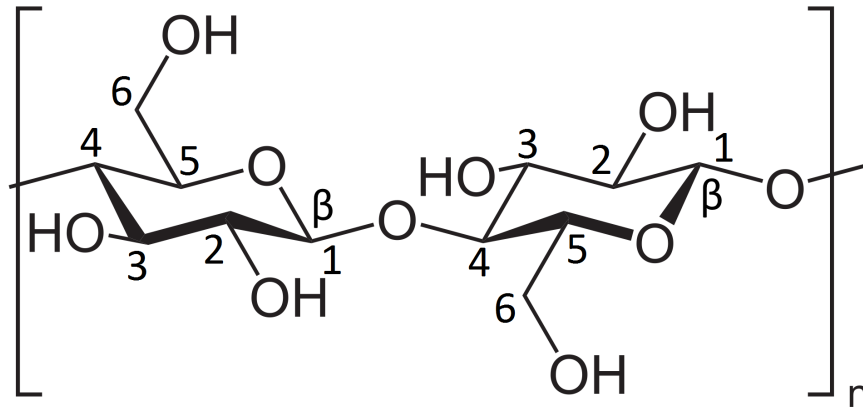
Selluloosaa esiintyy puussa, puuvillassa, hampussa ja muissa kasvipohjaisissa materiaaleissa [18], ja se on puuvartisten kasvien pääainesosa ja kantava komponentti [19]. Se on houkutteleva lähdemateriaali, koska se on uusiutuva, biohajoava ja sitä on runsaasti saatavilla. Lisäksi selluloosalla on matala tiheys, korkeat lujuusominaisuudet ja potentiaalia kemialliseen muokkaukseen. [20] Selluloosan potentiaali on valtava; uskotaan, että metsäpohjaiset raakamateriaalit voivat olla pääroolissa korvaamassa fossiilisia öljypohjaisia kuituja ja puuvillaa uusilla ekologisilla tekokuiduilla [17].

3.1 Selluloosan rakenne ja ominaisuudet

Selluloosa on tutkimuskohteena haastava: kuidut ovat pieniä ja niillä on kompleksinen komposiittirakenne, minkä lisäksi selluloosapinta on erittäin epätasainen ja heterogeeninen [19]. Luonnossa esiintyvässä selluloosassa ei ole lähes ollenkaan varausta [13], mikä vaikeuttaa sen liuottamista. Yleisesti ottaen selluloosa on kuitumainen, kestävä aine, joka ei liukene veteen [16].

3.1.1 Selluloosan rakenne

Selluloosa on β -D-glukopyranoosiyksiköistä koostuva homopolymeeri, jossa molekyylit ovat kiinnittyneet toisiinsa (1->4)-glykosidi-sidoksilla [21]. Se on moolimassaltaan suuri polymeeri, jossa jokainen glukosiyksikkö on kääntynyt 180° viereisiin yksiköihin verrattuna [16]. Luonnossa esiintyvät selluloosamolekyylit ovat vähintään 5000 nm pitkiä, jolloin niissä on noin 10 000 glukopyranoosiyksikköä [22], mutta yksiköitä voi yhdessä polymeeriketjussa olla jopa 20 000 [16]. Selluloosan molekyylirakenne on esitetty kuvassa 3.1.



Kuva 3.1 Selluloosamolekyylin kemiallinen rakenne. Selluloosamolekyylissä jokainen glukosiyksikkö on kääntynyt 180° viereisiin yksiköihin verrattuna. Yhdessä selluloosapolymeeriketjussa olla jopa 20 000 glukosiyksikköä. [16]

Vaikka selluloosa on kemiallisesti melko yksinkertainen molekyyli, luonnossa esiintyvän selluloosan fysikaalinen ja morfologinen rakenne on monimutkainen ja heterogeeninen [18], sillä se esiintyy kasvisolujen seinissä yhdistyneenä muihin biopolymeereihin [15]. Selluloosan rakenne ja biosynteesi kasvien soluseinissä ovatkin edelleen nykykasvitieteen suurimpia haasteita [23].

Luonnossa selluloosa ei esiinny yksittäisinä molekyyleinä, vaan molekyylit muodostavat noin 36 ketjun kimppuja kiertyessään toistensa lomaan biosynteesin aikana. Näitä kimppuja kutsutaan alkeisfibrilleiksi. [16] Rakenteelliselta kannalta katsottuna nämä selluloosananokuidut ovat selluloosakuitujen pienimpiä rakenneosia [1].

Selluloosamolekyylit sitoutuvat sekä itseensä että toisiinsa paitsi van der Waalsin voimilla myös vetysidoksilla [22], ja selluloosananokuidut pakkautuvatkin yhteen suuremmiksi yksiköiksi, joita kutsutaan mikrokuiduiksi [16]. Mikrokuidut koostuvat selluloosananokuitujen lisäksi muista rakenneosasista, kuten hemiselluloosasta, glykosylaattiproteiineista, pektiinistä ja ligniinistä [24], [23], [25]. Mikrokuidut puolestaan muodostavat selluloosakuituja [16].

Selluloosan lähdemateriaalista riippuen mikrokuitujen poikkileikkaus vaihtelee 2–20 nm [16] eikä niiden pituudesta ole varmaa tietoa [22]. Mikrokuiduissa on sekä kiteisiä että amorfisia alueita [15]. Kun niitä hajotetaan happohydrolyysillä, saadaan saavamaisia selluloosananokiteitä [1]. Kiteiden halkaisija on sama kuin alkuperäisillä mikrokuiduilla ja pituus nanometrin kymmenesosista useisiin mikrometreihin [26], jolloin pituuden suhde halkaisijaan vaihtelee lähteestä riippuen noin yhdestä sataan [27]. Selluloosananokiteiden morfologia ja kiteisyys ovat samanlaiset kuin alku-

peräisillä selluloosakuiduilla [1].

3.1.2 Ominaisuudet

Selluloosaa on vaikea liuottaa, sillä se ei liukene veteen eikä tyypillisiin orgaanisiin liuottimiin. Se liukenee kuitenkin muutamiin liuotinryhmiin, joilla ei ole ilmeisiä yhteisiä ominaisuuksia. Koska monet selluloosan liuotusmenetelmät ovat joko kalliita tai ympäristölle haitallisia, tarve uusien menetelmien kehittämiseen on suuri. Onkin esitetty, että koska selluloosa on amfiifilinen molekyyli, jossa on sekä hydrofobinen että hydrofiilinen osa, se liukenee parhaiten amfiifilisiin liuottimiin. [17] Nykyisin selluloosaa liuotetaan tyypillisesti ionisiin liuottimiin.

Selluloosananokuitujen tärkeä ominaispiirre on niiden hydrofiilisyyden [18]. Selluloosa, jossa on useita hydroksyyli-ryhmiä, on melko poolinen molekyyli, ja siten sillä on hyvä kyky muodostaa vetysidoksia [17]. Suunnittelusta sovelluskohteesta riippuen selluloosan korkea vedensitomiskapasiteetti voikin olla joko haluttu tai ei-toivottu ominaisuus [25].

3.2 Nanoselluloosan käyttötarkoitukset

Biologisesti johdettujen materiaalien tutkimus ja käyttö ovat viime aikoina herättäneet enemmän kiinnostusta, kun polymeeriteknologia ja bioteknologia ovat kehittyneet [19]. Esimerkiksi nanomittakaavan selluloosakuitujen tuotanto ja niiden sovelluskohteet komposiittimateriaaleissa ovat keränneet kasvavaa huomiota, sillä selluloosananokuidut ovat kevyitä, biohajoavia ja uusiutuvia. Lisäksi niillä on korkea lujuus ja jäykkyys sekä hyvä saatavuus. [18]

Mikrokuituista selluloosaa voidaan käyttää useisiin tarkoituksiin [28], esimerkiksi nanokomposiitteihin [29], [30], [31], [32], [33], [34], dispersioiden stabiloimiseen [35] ja antibakteerisiin kalvoihin [36]. Mikrokuituisen selluloosan käyttö täyteaineena myös parantaa polymeerin mekaanisia ominaisuuksia, kuten vetolujuutta ja kimmo-moduulia, paljon tehokkaammalla tavalla kuin perinteisillä mikro- tai makrokompasiittimateriaaleilla on saatu aikaan [18]. Lisäksi selluloosananokuiduista on saatu lupaavia tuloksia useissa sovelluksissa, kuten biolääketieteessä [37], kaasun sulku-kalvoissa [38] ja läpinäkyvissä toiminnallisissa materiaaleissa [39], [40], [41].

Tiedetään, että muiden molekyylien on vaikea läpäistä selluloosakuitujen kiteisiä osia [28]. Koska mikrokuituisen selluloosan ominaispinta-ala on suuri ja kuidut ovat pitkiä ja kapeita, mikrokuituinen selluloosa esiintyy jo hyvin laimeissa suspensioissa viskoosina geelinä, jossa kuidut muodostavat hämähäkinseinän kaltaisen

verkon [42], [43], [44]. Kuivattuna kuidut muodostavat tiiviin verkon, joka pysyy kasassa voimakkaiden kuitujen välisten sidosten ansiosta. Näiden ominaisuuksien takia on ajateltu, että mikrokiteinen selluloosa voisi olla kiinnostava vaihtoehto esimerkiksi muoveille. [28]

Selluloosananokiteiden fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ovat erinomaiset, ja lisäksi ne ovat luontaisesti uusiutuva, kestävä ja runsaasti saatavilla oleva materiaali. Niiden halvan hinnan, keveyden ja ainutlaatuisen morfologian takia niiden käyttöä vahvistusaineena nanokomposiiteissa onkin tutkittu laajalti. [16] Nanokiteistä selluloosaa on käytetty esimerkiksi biokuvantamisessa [45] ja nanokomposiiteissa [34].

Selluloosa on verrattain halpa ja varsin lupaava nanomittakaavan vahvikemateriaali polymeereille. Varsinkin ympäristönäkökulmasta on erittäin houkutteleva ajatus, että biohajoavasta selluloosasta ja biohajoavista, uusiutuvista polymeereistä voitaisiin tehdä täysin biohajoavia komposiittirakenteita. [18] Kiinnostusta biologisesti johdettujen materiaalien tutkimiseen lisää myös mahdollisuus käyttää niitä biopolttoaineen vaihtoehtoisena lähteenä [19].

3.3 Nanoselluloosan valmistukseen käytetyt lähdemateriaalit

Nanoselluloosaa on valmistettu lukuisista eri materiaaleista [22] ja kutakin lähdemateriaalia varten on kehitetty omat hydrolyysi- ja erotusmenetelmänsä [16]. Puu on selluloosakuitujen tärkein teollinen lähde [18], ja siitä on valmistettu myös nanokuituista selluloosaa [46], [47].

Usein aloitusmateriaalina käytetään valkaistua sulfaattisellua [18]. Selluloosananokuitua onkin valmistettu sulfaattisellusta [48], valkaistusta sulfaattisellusta [49], [50], lehtipuusta valmistetusta valkaistusta sulfaattisellusta [51], [52], [53], [54], havupuun liuotusmassasta [55] ja valkaistusta sulfiittiselluloosasta [56]. Nanokiteistä selluloosaa on valmistettu valkaistusta lehtipuumassasta [57], valkaistusta havupuun sulfiittimassasta [57] ja valkaistusta havupuun sulfaattisellusta [58].

Puuta tarvitaan kuitenkin myös rakennus-, huonekalu-, sellu- ja paperiteollisuuteen ja lisäksi sitä poltetaan energiaksi. Tästä syystä kuidut viljelykasveista, kuten pellavasta, hampusta ja sisalista sekä erityisesti niiden sivutuotteista, tulevat luultavasti olemaan kasvavan kiinnostuksen kohteina. [18]

Selluloosaa esiintyy laajasti korkea-asteisemmissä kasveissa, joissa sillä on merkittävä rooli kasvien soluseinämien rakenteen säilyttämisessä [16]. Kasvikuidut ovat halpoja, uusiutuvia ja runsaasti saatavilla [47]. Lisäksi ne voidaan erottaa nanokuiduiksi, jotka ovat ohuempia kuin kuidut bakteeriselluloosasta ja vaippaeläimistä

[56]. Erittäin puhdasta nanoselluloosaa on eristetty useista eri kasvilähteistä [47]. Nanokuituista selluloosaa on saatu pellavasta [49], [47], hampusta [49], [59], sisalkuidusta [60], [34], puuvillasta [61], [62], [56], bambusta [63], [47], sokerijuurikkaan sisuksesta [64], [65], [66], [67], [68], perunan mukulasta [69] ja lantusta [49]. Selluloosananokiteita on valmistettu pellavasta [70], [71], hampusta [72], sisalkuidusta [73], [34] ja kiinanruohosta [74], [15], [20]. Nämä kasvit sisältävät vähemmän ligniiniä kuin puu, joten niiden valkaisumenetelmät ovat yksinkertaisempia [18].

Uusiutuvuutensa takia viljelykasvien jäännökset voivat olla luonnon nanokuitujen arvokas lähde [75]. Nykyään nämä maatalouden sivutuotteet joko poltetaan tai käytetään biopolttoaineiden tai alhaisen hintaluokan tuotteiden, kuten eläinten rehun, valmistukseen [18]. Lisäksi kun sivutuotteita, kuten mehun puristuksessa syntyvää massaa, käytetään raakamateriaaleina, selluloosan erottamiseen tarvitaan vähemmän prosessointivaiheita [29].

Selluloosananokuitua on valmistettu esimerkiksi vehnän oljesta [76], [47], soijapavun kuoresta [76], lantun juuresta [29], sokeriruokojätteestä [77], banaanin ruodista [78], [79], ananaksen lehdistä [80] ja viikunakaktuksen rungosta (*Opuntia ficus-indica*) [81], [32]. Nanokiteistä selluloosaa on valmistettu esimerkiksi kookospähkinän kuoresta [82], vehnän oljesta [83], silkkiäispuun kuoresta [84] ja herneenpalosta [85].

Selluloosaa esiintyy useissa merieläimissä [16], kuten esimerkiksi Välimeressä elävissä vaippaeläimissä [22]. Vaippaeläimiä [86], [87] ja niiden elimistössä tuotettua selluloosaa [15], [88], [89] on käytetty nanokiteisen selluloosan valmistukseen. Vaippaeläinten tuottamasta selluloosasta on saatu myös selluloosananokuitua [56]. Myös vaippaeläinten vaipan sisällä olevasta tukikudosta, lihasta, verisuonia ja hermoja sisältävästä kudoksesta on valmistettu sekä nanokiteistä selluloosaa [90] että selluloosananokuitua [91].

Vähäisemmissä määrin selluloosaa esiintyy myös levissä, sienissä, bakteereissa, selkärangattomissa ja jopa ameboissa (alkueläimet) [16]. Monista bakteerisuvuista, ainakin *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ja *Sarcina*, onkin raportoitu selluloosaa tuottava kanta. Näistä suvuista vain *Sarcina* on Gram-positiivinen, muut ovat Gram-negatiivisia. [92]

Selluloosaa tuottavista bakteereista *Acetobacter*-kanta, joka myöhemmin luokiteltiin *Gluconacetobacter*-suvuksi, on erityisen sopiva selluloosan tuottamiseen [93]. *Acetobacter xylinum* -bakteerin käytöstä selluloosan tuotannossa raportoi ensimmäisenä A. J. Brown vuonna 1886, ja sitä pidetään edelleen tehokkaimpana selluloosan tuottajana [94]. Lisäksi *Acetobacter xylinum* -bakteerit eivät aiheuta tauteja, ne

esiintyvät yleisesti hedelmissä ja hedelmätuotteissa ja niitä voi viljellä laboratorioolosuhteissa [93].

Esimerkiksi vihreästä merilevästä (*Cladophora*) on valmistettu selluloosananokuitua [95] ja bakteeriselluloosasta nanokiteistä selluloosaa [96], [97], [98], [56]. Tutkimuskäyttöön nanokiteistä selluloosaa on valmistettu myös Whatman-suodatinpaperista [99], [100], [101], [102], [103], Whatman-selluloosajauheesta [104] ja mikrokiteisestä selluloosasta [105], [99].

3.4 Nanokiteisen selluloosan valmistus

Nanokiteistä selluloosaa voi valmistaa useilla eri tavoilla ja monista eri materiaaleista, kuten kerrottiin edellä alaluvussa 3.3. Ensisijaisesti selluloosananokiteiden valmistamiseen on käytetty happohydrolyysiä, joka poistaa amorfiset alueet selluloosakuiduista ja jättää kiteiset alueet ennalleen [22]. Yleisimmin happohydrolyysissä käytetään joko rikkihappoa tai suolahappoa, mutta myös fosfori- ja vetybromidihappoa on käytetty samaan tarkoitukseen [16].

Rikkihappohydrolyysissä rikkihapon konsentraatio on useimmissa menetelmissä noin 65 m-%, mutta lämpötila vaihtelee huoneenlämmöstä 70 °C:seen ja hydrolyysiaika vastaavasti lämpötilasta riippuen 30 minuutista yön yli kestävään hydrolyysiin [16]. Seuraavaksi on kuvattu yksi tapa valmistaa nanokiteistä selluloosaa. Tämän menetelmän julkaisivat C. Edgar ja D. Gray vuonna 2003 [106] ja sitä on sen jälkeen hyödynnetty monissa muissa julkaisuissa (esimerkiksi [103] ja [57]).

Puuvillakuidusta (Whatman No. 1 suodatinpaperi) valmistettiin kolloidinen selluloosananokidesuspensio. Ensin suodatinpaperi jauhettiin Wiley-myllyllä siten, että se läpäisi 1 mm:n verkon. Sitten näyte hydrolysoitiin 64 m-% rikkihapolla 45 °C lämpötilassa 45 minuutin ajan. Tyypillisesti 40 grammaan puuvillaa tarvittiin 700 ml happoa. [106]

Heti hydrolyysin jälkeen suspensio laimennettiin 10-kertaisesti, jotta reaktio pysähtyi. Sitten suspensio pestiin toistuvasti laimentamalla vedellä ja sentrifugoimalla, kunnes supernatantin pH oli suurempi kuin 1. Seuraavaksi näytettä dialysoitiin vettä vasten useita päiviä. [106]

Dialyysin jälkeen näytettä pidettiin sonikaattorissa 7 minuutin jaksoissa yhteensä 35 minuutin ajan. Suspensiota jäähdytettiin jaksojen välissä jäähauteessa. Suspension annettiin olla kontaktissa ioninvaihtohartsin (Sigma) kanssa 48 tuntia ja suodatettiin sitten kovetetun, tuh kattoman, kvalitatiivisen suodatinpaperin (What-

man 541) läpi. Whatman-suodatinpaperista saadun lopullisen vesiliukoisen suspension konsentraatio oli 2,4 m-% ja sen pH oli 2,0. [106]

3.5 TEMPO-välitteinen hapetus

Hydrolyysin aikana lähes äärettömän pitkät selluloosamikrofibrillit pilkotaan lyhyemmiksi kiteisiksi kappaleiksi, selluloosananokiteiksi, joiden pienestä koosta johtuen niitä on käsiteltävä liuksena joko vedessä tai orgaanisessa liuottimessa [26]. Rikkihappohydrolyysi jättää selluloosananokiteiden pinnalle vesiliukoisuutta parantavia sulfaattiryhmiä, mutta ne ovat melko epävakaita ja irtoavat helposti heikosti emäksisissä olosuhteissa [16]. Suolahappohydrolyysin jäljiltä selluloosananokiteiden pinnalle ei jää vastaavia ryhmiä, joten niiden dispergoituminen on vähäisempää ja selluloosananokiteilla on voimakkaampi taipumus saostua [107]. Jotta liuoksia voitaisiin käyttää mahdollisimman tehokkaasti, on tärkeää optimoida selluloosananokiteiden liukoisuus [26].

Koska selluloosan pinnalla on luonnostaan runsaasti hydroksyyli-ryhmiä, selluloosamateriaaleja on yritetty muokata monin eri tavoin, esimerkiksi esterifikaatiolla, eetterifikaatiolla, hapetuksella, silyloinnilla ja sivuketjujen lisäämisellä [16]. 2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyli-välitteinen (TEMPO-välitteinen) hapetus on lupaa-va keino muuttaa pinnan hydroksyyli-ryhmiä varautuneiksi karboksyyli-ryhmiksi, jotka ovat huomattavasti pysyvämpiä kuin epävakait sulfaattiryhmät [26].

Selluloosananokuitujen valmistaminen mekaanisilla menetelmillä vaatii valtavasti energiaa, mutta lopputulos jättää silti toivomisen varaa [56]. Vielä ei ole onnistuttu kehittämään menetelmää, jossa pelkillä mekaanisilla menetelmillä saataisiin valmistettua pitkiä, veteen dispergoituneita yksittäisiä selluloosananokuituja [54]. Lupaavaksi on kuitenkin osoittautunut menetelmä, jossa kemiallisella käsittelyllä mikrokuitujen pinnalle lisätään negatiivinen varaus, joiden aiheuttamat repulsiiviset voimat helpottavat yksittäisten mikrokuitujen erottamista [56]. Pinnan muokkaus vähentää selluloosananokuitujen välistä voimakasta adheesiota, sillä se estää kuitujen välisten voimakkaiden vetysidosten muodostumista [54].

TEMPO-välitteisessä hapetuksessa stabiili nitroksyyli-radikaali, 2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-oksyli, lisätään selluloosan pinnalle [16]. Usein NaClO₂:ta on käytetty primääriseen hapettimena pH:ssa 11 ja NaBr:ä täydentävänä katalyyttinä pH:ssa 9. Emäksisessä pH:ssa tapahtuu kuitenkin ei-toivottuja sivureaktioita, ja selluloosan pinnalle jää aldehydyryhmiä. Nämä ongelmat vältetään, kun hapetus tehdään neutraaleissa tai hieman happamissa olosuhteissa käyttäen NaClO₂:ta primääriseen hapettimena ja NaClO:ta täydentävänä katalyyttinä. [51]

Kemiallisten muunnosten suurin haaste on luoda menetelmä, joka muuttaa vain selluloosananokiteiden pintaa ja säilyttää kiteiden alkuperäisen muodon ja rakenteen [16]. TEMPO-välitteisellä hapetuksella näytteet säilyttivät alkuperäisen muotonsa ja luontaisen kiteisyytensä, mutta pinnan hydroksyyliiryhmät korvautuivat negatiivisesti varautuneilla karboksyyliiryhmillä, jotka eivät saostuneet vesiliuoksesta [26]. Pinnan hydroksimetyyliiryhmistä vain puolet voivat reagoida, sillä toinen puoli on hautautuneina kohti selluloosan keskiosaa [16]. Pinnan kaikki saavutettavissa olevat hydroksimetyyliiryhmät korvautuivat karboksyyliiryhmillä, mutta kiteiden sisus säilyi täysin muuttumattomana. Pinnassa olevat varaukset tekevät kiteistä helposti veteen liukenevia. Karboksyyliiryhmät ovat stabiileja eivätkä ole poistettavissa. [26]

TEMPO-välitteisen hapetuksen ja homogenisointikäsittelyn yhdistelmällä selluloosakuidut saatiin jaettua pienemmiksi kuin muilla menetelmillä käyttäen huomattavasti vähemmän energiaa niihin verrattuna [56]. Erotetut selluloosananokuidut dispergoituivat veteen ja muodostivat lähes läpinäkyviä, erittäin viskooseja dispersioita [54]. Sen lisäksi, että hapetusreaktio rajoittuu halutulla tavalla vain pinnan primäärisiin hydroksyyliiryhmiin, se on myös ympäristöystävällinen ja yksinkertainen toteuttaa [16].

4. KALVOJEN VALMISTUS SELLULOOSAMATERIAALEISTA

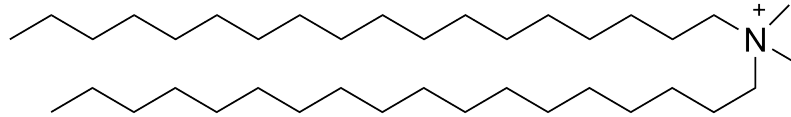
Ohutkalvoja on valmistettu selluloosamateriaaleista Langmuir-tekniikalla jo yli 20 vuotta [108]. Ohutkalvoja on tehty myös muilla tavoilla, kuten esimerkiksi spin-coating-menetelmällä. LS-kasvatettujen selluloosakalvojen etu muilla menetelmillä valmistettuihin kalvoihin verrattuna on, että ne ovat erittäin sileitä [19] ja kalvon paksuutta voidaan säädellä tarkasti.

Varhaisempiin selluloosasta valmistettuihin ohutkalvoihin on käytetty trimetyyli-silyliselluloosaa (TMSC), joka on kasvatuksen jälkeen muunnettu hydrolysoimalla regeneroiduksi selluloosaksi [13], [108]. Tekniikka on vakiintunut käyttöön, ja se on helppo toteuttaa [15]. 15 kastamiskierrosta on riittänyt muodostamaan täysin peittävän, ohuen, sileän, jäykän ja toistettavissa olevan selluloosakalvon [13]. Uudempi tekniikka selluloosakalvojen valmistamiseen nanokiteisestä selluloosasta on kuvattu seuraavaksi alaluvussa 4.1. Puhtaan nanokuituisen selluloosan LS-kalvoista ei ole julkaistuja tuloksia.

4.1 Kalvojen valmistus nanokiteisestä selluloosasta

Nanokiteisestä selluloosasta on aiemmin valmistettu ohutkalvoja LS-tekniikalla käyttäen apuna positiivisesti varautunutta pinta-aktiivista ainetta dioktadekyylidime-tyyliammonium-ionia (DODA) [1], jota tarvittiin nostamaan negatiivisesti varautuneet selluloosamolekyylit alafaasista sen pinnalle. DODA:n rakennekaava on esitetty kuvassa 4.1. Kalvoja ei ole tiettävästi tehty ilman DODA:a eikä nanokuituisesta selluloosasta. Nanoselluloosakalvoja on aiemmin valmistettu seuraavissa kappaleissa kuvatulla menetelmällä.

Nanoselluloosakalvo muodostettiin 20 ± 1 °C:en lämpötilassa käyttäen Langmuir-allasta, joka oli varustettu Wilhelmy-tyyppisellä pintavaa'alla. 20 μ l DODA-liuosta (1 mg/ml) levitettiin juuri ultraäänipestyn selluloosa-vesi-suspension pinnalle. Selluloosasuspensio sisälsi vastaavan konsentraation joko sisal-, puuvilla- tai kiinanruohoselluloosananokiteitä. Systeemin annettiin stabiloitua 15 minuuttia, minkä



Kuva 4.1 Dioktadekyylidimetyyliammonium-ioni (DODA) on kationinen pinta-aktiivinen aine, jota on käytetty apuna LS-kalvojen valmistamisessa nanokiteisestä selluloosasta.

jälkeen pintaa puristettiin pienentämällä puomien välistä etäisyyttä altaan pinnalla nopeudella 2 mm/min. [1]

Sopivassa pintapaineessa kalvo siirrettiin kultasensoreille käyttäen vaakasuoraa siirtotapaa, eli asettamalla poikittain oleva kiinteä substraatti kosketukseen puristetun pinnan kanssa nopeudella 1 mm/min. Kiinteän alustan annettiin koskea selluloosananokide-DODA-kerrokseen muutaman sekunnin ajan, minkä jälkeen kiinteä substraatti otettiin pois peruutusnopeudella 1 mm/min. Substraatin annettiin kuivua 10 minuuttia ennen kuin se otettiin pois pidikkeestä. Positiivisesti varautuneet DODA-molekyylit, jotka muodostivat liukenemattoman yksikerroksen pinnalle, toimivat vesiliukoisessa alafaasissa dispersiona olevien negatiivisesti varautuneiden selluloosananokiteiden kuljettajina. Tätä menetelmää käyttäen kiinteä alusta päällystettiin kolmella kerroksella, jotka koostuivat alkaanitoliosta (hydrofobinen kerros), DODA:sta (sitova kerros) ja selluloosananokiteistä (aktiivinen kerros). [1]

4.2 Ca^{2+} -ionien vaikutus

Selluloosarakenteiden fysikaalisia ominaisuuksia voidaan muokata silloittamalla kuituja esimerkiksi Ca^{2+} -ioneilla. Aiemmin asiaa on selvitetty tutkimuksessa, jossa nanokuituisesta selluloosasta tehtiin vesigeeli lisäämällä siihen kationeja. Siinä selvitettiin, miten nanoselluloosasuspension konsentraatio ja käytettävien kationien varaus vaikuttivat muodostuvan vesigeelin ominaisuuksiin. Al^{3+} -, Ca^{2+} - tai H^{+} -kationiliuos kaadettiin varoen selluloosasuspension päälle, jolloin suspensio geeliytyi nopeasti. Koska kationiliuoksen diffuusio ilman sekoitusta oli hidasta, geelin annettiin muodostua yön yli ennen kuin se pestiin. Kationin lisäys aiheutti ionista silloittumista ja vetysidosten muodostumista, joiden seurauksena muodostunut geeli ei ollut yhtä läpinäkyvää kuin alkuperäinen selluloosananokuitususpensio. [109]

Kolmenarvoisilla Al^{3+} -kationeilla valmistettu vesigeeli oli jäykin ja sillä oli suurin puristuluskuus, minkä perusteella sen pääteltiin muodostavan vahvimman ionisen silloittumisen kuitujen sisäisesti ja välillä. Suuremmasta varauksesta aiheutui myös

suurempi huokoisuus ja tiukempi verkkorakenne. Tulokset osoittivat, että kun selluloosakonsentraatiota ja kationien määrää kasvatettiin, se paransi muodostuneen vesigeelin mekaanisia ominaisuuksia. Vesigeelin sisäinen rakenne vaikutti huomattavasti sen ominaisuuksiin. [109]

4.3 Proteiinit

Tätä diplomityötä aloitettaessa ei ollut tiedossa, että kukaan olisi aiemmin tehnyt kalvoja nanoselluloosasta ja laminiinista tai kollageenista. Työn tekemisen aikana julkaistiin artikkeli, jossa nanokiteisestä selluloosasta ja kollageeni 1:stä kehitettiin nanokomposiitteja kahdella eri menetelmällä kolmea eri pehmennintä (sorbitoli, glyseroli, polyetyleeniglykoli) käyttäen. Kollageeni-, selluloosa- ja pehmenninliuokset sekoitettiin toistensa kanssa eri järjestyksissä, saatu liuos kaadettiin muoviasastiaan ja näyte kuivattiin 40 °C:ssa, kunnes liuos oli täysin haihtunut ja kalvo muodostunut. Kollageeni 1:n ja nanokiteisen selluloosan havaittiin vuorovaikuttavan toistensa kanssa kemiallisesti, jolloin nanokiteinen selluloosa vahvisti kollageenia ja paransi nanokomposiitin mekaanisia ominaisuuksia. Lisäksi kalvon lämmönkestävyys parani. [8]

Laminiinit ovat moolimassaltaan suuria glykoproteiineja, jotka muodostuvat kolmesta disulfidi-sidoksella yhteen liittyneestä polypeptidistä, joita kutsutaan α -, β - ja γ -ketjuiksi [5]. Jokainen laminiinimolekyyli on kolmen molekyylin heteropolymeeri eli heterotrimeeri, joka on moolimassaltaan 500–900 kD, ja ketjuista jokainen on moolimassaltaan 200–450 kD [6]. α -ketjuista on löydetty 5, β -ketjuista 3 ja γ -ketjuista 3 geneettistä muunnosta [110]. Laminiinit nimetään ketjujen perusteella siten, että esimerkiksi laminiini, joka koostuu α 1-, β 1- ja γ 1-ketjuista, on nimetty laminiini 111:ksi [5].

Aikuisessa ihmisessä esiintyvät yleisimmin ne laminiinimuodot, joissa on α 5-ketju, erityisesti laminiinit 511 ja 521 [5]. Laminiini 521 esiintyy munuaisten podosyyteissä (erityisissä sormimaisilla ulokkeilla varustetuissa munuaiskeräsen epiteelisoluissa) ja alkion kantasoluissa. Laminiini 521 edistää yhdessä laminiini 511:n kanssa kantasolujen kasvua, mutta ei niiden erilaistumista. [110] Laminiinien N-terminaalit osallistuvat vuorovaikutuksiin pääasiassa muiden tyvikalvossa olevien solunulkoisten molekyylien kanssa. Niinpä ne ovat tyvikalvon rakenteen ja fysiologian kannalta tärkeän solunulkoisten molekyylien muodostaman monimutkaisen verkon keskeinen osa. [5]

Kollageeneja on yli 20 erilaista tyyppiä, joilla on niiden rakenteesta riippuen monia tehtäviä. Kaikilla kollageeneilla on kuitenkin karakteristinen kolmen polypep-

tidiketjun muodostama oikeakätinen kolmoiskierre. Kollageenit ovat soluväliaineen yleisimpiä proteiineja. Niillä on tärkeitä mekaanisia tehtäviä erityisesti sidekudoksissa, joiden päärakennusaine ne ovat. Noin 90 % kollageeneista on kuitumaisia, ja ne luovatkin suurimman osan niistä biomekaanisista ominaisuuksista, jotka ovat välttämättömiä luiden, jänteiden, lihaskalvojen ja nivelrustojen toiminnan kannalta. [7]

Kollageeni 1 on yleisin ja tarkimmin tutkittu kollageenityyppi. Se kuuluu kuitumaisiin kollageeneihin, joita esiintyy luissa, verinahassa, jänteissä, nivelsiteissä ja sarveiskalvossa. Kollageeni 1:llä on kyky muodostaa tarkasti suuntautuneita useamman molekyylin rakenteita, joilla on karakteristinen rakenne. Kollageeni 1 muodostaa yli 90 % luun orgaanisesta aineksesta. Se muodostaa luun koossa pitävän rungon ja saa aikaan luun kantavuuden, vetolujuuden ja vääntöjäykkyyden erityisesti kalkkeutumisen jälkeen. Lisäksi kollageeni jänteissä, ihossa, nivelsiteissä ja sarveiskalvossa on pääosin kollageeni 1:tä. Jänteissä ja lihaksia peittävässä sidekudoskalvoissa kollageeni 1 lisää kimmoisuutta. [7]

Kollageeni 4 kuuluu tyvikalvokollageeneihin. Verkkorakenteita muodostavaa kollageeni 4:ä esiintyy vain tyvikalvoissa, joiden tärkein rakenteellinen komponentti se on. Tyypin 4 kollageeneilla on joustavampi kolmoiskierre kuin muilla kollageeneilla, ja ne muodostavat verkkoja, joita esiintyy vain tyvikalvoissa. [7]

Aiemmin LS-tekniikalla on onnistuttu kasvattamaan kalvoja, jotka sisältävät sekä kollageeni 1:tä että kollageeni 4:ää. Esimerkiksi silmän solut kasvavat kollageenilamiini-matriisin päällä. LS-kasvatetun proteiinikalvon etu adsorptiolla valmistettuun solukasvatusalustaan verrattuna on, että se on tasaisempi eikä sisällä huonoja kohtia yhtä paljon. [111] Tässä työssä pyrkimyksenä oli saada proteiinit kiinnitetyä selluloosaan, jotta proteiinkasvatusalustaa ei tarvitsisi irrottaa kasvatusalustasta, jolloin on riski, että kalvo hajoaa. Laminiinista puolestaan on jo kaupallisesti saatavilla muoto, joka on riittävän puhdas ihmiskehossa käytettäväksi.

5. KOKEELLISET MENETELMÄT

Tutkimuksessa käytettiin kolmea erilaista nanoselluloosatyyppiä. Nanokiteinen selluloosa valmistettiin itse suodatinpaperista kemiallisesti hajottamalla, ja mekaanisesti erottamalla valmistetut selluloosananokuidut saatiin valmiina Helsingin yliopiston farmasian laitokselta. Toinen selluloosananokuitunäytteistä oli nanokuituista selluloosaa ja toinen hapetettua anionista nanokuituista selluloosaa.

5.1 Nanokiteisen selluloosan valmistus

Tässä tutkimuksessa käytetty nanokiteinen selluloosa valmistettiin itse kemiallisesti hajottamalla suodatinpaperista (Munktell, general purpose filter paper, size: Ø 110 mm, Grade 1001, Art. no: 211 004, Batch no: 2221) alaluvussa 3.4 esitetyn ohjeen mukaan [106]. Artikkelin [106] kuvaus on kuitenkin hieman epätarkka, joten ei voida sanoa, että tässä tutkimuksessa valmistettu nanokiteinen selluloosa olisi tehty täysin samalla tavalla kuin artikkelissa. Valmistustapaa myös sovellettiin hieman vastaamaan paremmin käytettävissä olevia välineitä ja kemikaaleja.

Suodatinpaperiin lähdemateriaalina päädyttiin, koska se on puhdasta selluloosaa, josta kaikki epäpuhtaudet on poistettu jo valmistusvaiheessa. Näin nanokiteistä selluloosaa valmistaessa ei tarvinnut murehtia lähdemateriaalin puhdistamisesta. Käytetyt astiat ja välineet tiskattiin huolellisesti tiskiharjalla ja tiskiaineella kaiken kiintoaineksen poistamiseksi. Lopuksi astiat ja välineet huuhdeltiin milli-Q-vedellä. Kaikki punnitukset tehtiin vaa'alla Precisa 205 A SuperBal-series Swiss Quality.

5.1.1 Selluloosan jauhaminen

Koska repivää myllyä ei ollut käytettävissä, selluloosan jauhamiseen kokeiltiin eri menetelmiä. Ensimmäinen hienonnuserä leikattiin saksilla neliömillimetriä pienemmiksi palasiksi ja jauhettiin sen jälkeen morttelilla. Jauhamista varten silppu kostutettiin milli-Q-vedellä. Kuivumisen alkuvaiheessa sitä käännettiin spaattelilla hienorakeisuuden säilyttämiseksi. Näyte oli täysin kuiva vuorokauden kuivumisen jälkeen ja olisi luultavasti kuivunut lyhyemmässäkin ajassa. Silmämääräisesti arvioiden

lopputulos olisi varmasti läpäissyt 1 mm:n verkon, jota oli käytetty sovelletussa kirjallisuusohejeessa. Menetelmän ongelma oli, että kohtuullisella työmäärällä valmista, hienojakoiseksi jauhattua selluloosaa saatiin vain n. 0,1 g. Suodatinpaperin leikkaaminen oli hidasta, ja hävikkiä syntyi, kun sähköinen silppu lenteli ympäri laboratoriota.

Toiseen hienonnuserään leikattiin saksilla kaksi suodatinpaperia 2–4 mm²:n kokoisiksi palasiksi, minkä jälkeen sitä jauhettiin kosteana morttelilla. Ongelmia menetelmässä oli useita. Suodatinpaperin leikkaamiseen kului huomattavan kauan aikaa. Selluloosaa oli niin paljon (n. 1 g), että sitä ei juuri saanut jauhattua morttelilla. Lisäksi kuivumiseen kului selvästi yli vuorokausi, mutta neljä vuorokautta riitti hyvin. Lopputulos ei olisi läpäissyt 1 mm:n verkkoa, mutta kävi ilmi, että se oli siitä huolimatta riittävän hienoa rikkihappohydrolyysiin.

Kolmanteen hienonnuserään leikattiin saksilla 8 suodatinpaperia (n. 7 g) niin pieniksi palasiksi kuin helposti ja nopeasti saa. Palojen koko oli n. 5 mm x 5 mm. Palat laitettiin runsaaseen veteen siten, että ne uiskentelivat siinä. Sitten palat hienonnettiin sauvasekoittimella paperimassaksi. Menetelmä oli helppo ja nopea saksilla leikkaamiseen verrattuna, ja lopputulos oli hyvin hienontunutta ja huokoista. Ongelmana oli kuitenkin saada yhtenäinen paperimassa kuivumaan irtonaisiksi palasiksi, koska sillä oli taipumus paakkuuntua suuriksi möykyiksi. Menetelmä myös vaati onnistuakseen melko suuren määrän suodatinpaperia.

Neljänteen hienonnuserään käytettiin 2 g sauvasekoittimella hienonnettua ja kuivatua kolmannen hienonnuserän selluloosaa. Se kostutettiin ja sitä jauhettiin morttelilla pienemmäksi. Morttelin vaikutus jäi vähäiseksi, mutta suurempi hyöty syntyi, kun selluloosan sai märkänä jaettua pinseteillä pienemmiksi palasiksi, jolloin lopputulos oli kuivana hienompijakoista.

5.1.2 Rikkihappohydrolyysi

Selluloosan hydrolysoimiseen käytettiin 60 m-%:sta rikkihappoa. Hydrolyysi tehtiin vetokaapissa luukku alas laskettuna, minkä lisäksi dekantterilasi peitettiin parafilillä. Liuoksia ei sekoitettu kuumennuksen aikana, koska siitä ei ollut mainintaa artikkelissa. Taulukkoon 5.1 on koottu eri valmistuserissä käytetyt suodatinpaperi-, rikkihappo- ja milli-Q-vesimäärät.

Ensimmäinen yritys nanokiteiseksi selluloosaksi tehtiin, kun ensimmäiseen hienonnuserään 0,1 g selluloosaa lisättiin 2 ml rikkihappoa, minkä jälkeen se laitettiin lämpölevylle (VWR Hotplate/Stirrer). Lämpötila-anturin ongelman takia rikkihapposeos kuumeni n. 80 °C:seen, ja koko liuos musteni täysin. Koska korkein rikkihap-

Taulukko 5.1 Nanokiteistä selluloosaa valmistettiin 5 erää. Eri valmistuserissä käytetyt selluloosat hienonnettiin eri tapoja käyttäen. Valmistuserissä käytetyt suodatinpaperi-, rikkihappo- ja milli-Q-vesimäärät on kerrottu taulukossa.

Nanokiteinen selluloosa	Selluloosa (g)	Rikkihappo (ml)	Milli-Q-vesi (ml)
1. erä	0,1	2	20
2. erä	0,5000	8,75	90
3. erä	0,5280	9	90
4. erä	2,0604	35	350
5. erä	2,0047	35	350

pohydrolyysissä käytetty lämpötila on 70 °C [16], on todennäköistä, että seos paloi pohjaan. Seosta yritettiin sentrifugoida, mutta sen todettiin menneen pilalle, ja sen valmistus jätettiin kesken.

Seuraavissa rikkihappohydrolyyseissä käytettiin lämpömittaria, joka laitettiin parafilmillä peitetyyn dekantterilasiin. Rikkihapon lisäämisen jälkeen rikkihappo-selluloosa-seosta esikuumennettiin ensimmäisellä lämpölevyllä (TAMRO-APTA, 90-544 011, lämpötilasäätö 5) 2–2,5 minuuttia, kunnes seoksen lämpötila oli vähintään 40 °C, minkä jälkeen dekantterilasi siirrettiin toiselle lämpölevylle (VWR Hotplate/-Stirrer). Toisen lämpölevyn lämpötila säädettiin 75 °C:seen, koska oli todettu, että silloin liuoksen lämpötila pysyy n. 45 °C:ssa. Liuosta pidettiin toisella lämpölevyllä 45 minuutin ajan.

Toista hienonnuserää käytettiin kahteen eri nanoselluloosaerään. Toiseen erään nanokiteistä selluloosaa käytettiin 8,75 ml rikkihappoa ja 0,5000 g toisen hienonnuserän selluloosaa. Kahden minuutin esikuumennuksen aikana liuos musteni toisesta alareunasta, mutta muu liuos säilyi vaaleana. Tämä selittyy sillä, että liuosta ei sekoitettu. Kuumennuksen aikana kellertävä tai rusehtava sävy levisi muuhunkin liuokseen.

Myös kolmanteen erään nanokiteistä selluloosaa käytettiin toisen hienonnuserän selluloosaa. Liuoksen väri ei muuttunut kahden minuutin esikuumennuksen aikana, mutta kuumennuksen alussa liuos muuttui vaalean kellertävän rusehtavaksi.

Neljänteen erään nanokiteistä selluloosaa käytettiin kolmannen hienonnuserän selluloosaa. Liuosta esikuumennettiin 2,5 minuuttia. Kolmannessa hienonnuserässä selluloosa oli melko suurina möykkyinä ja alimpana olleet möykyt mustenivat kuumennuksen ensimmäisten 5 minuutin aikana samaan tapaan kuin pohjaanpalanut ensimmäinen hienonnuserä. Palaneet möykyt poistettiin reaktioseoksesta ennen dialyysia, mutta muuten valmistus tehtiin tavalliseen tapaan.

Viidenteen erään nanokiteistä selluloosaa käytettiin neljännen hienonnuserän selluloosaa. Liuosta esikuumennettiin 2,5 minuuttia. Kuumennuksen alkuvaiheessa liuos oli ruskea toisesta alareunastaan, mutta viides erä ei palanut samalla tavalla kuin neljäs erä nanokiteistä selluloosaa.

45 minuutin kuumennuksen jälkeen reaktio sammutettiin lisäämällä reaktioseokseen 10-kertainen määrä milli-Q-vettä. Seos jaettiin tarvittavaan määrään 50 ml:n sentrifugiputkia. Dekantterilasi huuhdeltiin pienellä määrällä milli-Q-vettä, jotta kaikki rikkihappo-selluloosa saatiin siirrettyä sentrifugiputkiin.

5.1.3 Sentrifugointi

Kaikki erät nanokiteistä selluloosaa sentrifugoitiin (Thermo Scientific Sorvall ST8 Centrifuge) samalla tavalla. 10 minuutin sentrifugoinnin (4500 rpm) jälkeen kirkas supernatantti kaadettiin lähes täysin pois ja sen pH mitattiin pH-paperilla. Jos pH oli alle 2, sentrifugiputkeen lisättiin milli-Q-vettä, ja se sentrifugoitiin uudestaan. Jos supernatantti ei ollut kirkas, eli siinä näkyi selluloosahitusia, supernatantti kaadettiin toiseen sentrifugiputkeen ja sentrifugoitiin uudestaan. Saman erän näytteitä yhdisteltiin mahdollisuuksien mukaan siten, että sentrifugiputkien määrä väheni. Kun supernatantin pH oli noin 2, sentrifugointi lopetettiin ja seos kaadettiin dialyysipussiin.

5.1.4 Dialysointi

Nanokiteisen selluloosan dialysointiin käytettiin dialyysiletkua (Spectra/Por 5 Dialysis Membrane, Standard RC Tubing, MWCO: 12-14 kDa, Nominal Flat Width: 75 mm, Diameter: 48 mm, Vol/Length: 18 ml/cm). Letkusta leikattiin saksilla hansikkaat kädessä sopivan pituisia palasia.

Dialyysiletkussa oli säilöntäaineena natriumatsidia. Sen poistamiseksi dialyysiletku laitettiin milli-Q-vedellä täytettyyn 1000 ml:n dekantterilasiin likoamaan viimeistään puoli tuntia ennen käyttöä ja huuhdeltiin uudella milli-Q-vedellä vielä juuri ennen käyttöä.

Kun nanoselluloosa oli siirretty pussiin, letkun päät suljettiin dialyysiletkun sulkimilla. Koska sulkimet olivat vain 75 mm:n pituisia, letkua jouduttiin pieneltä matkalta taittamaan kaksinkerroin sen molemmista päistä. Ohjeen mukaan suljinten pitäisi olla 4-10 mm letkua leveämpiä. Sulkimen painaminen kiinni kaksinkertaisen letkun päälle vaati reipasta voimankäyttöä, mutta suljin kiinnittyi hyvin ja näyte

vaikutti pysyvän pussissa ongelmitta. Näytteen vuotamista pois pussista ei havaittu missään dialysointierässä.

Dialyysipussi laitettiin 1000 ml:n dekantterilasiin, joka täytettiin milli-Q-vedellä. Magneettisekoitus säädettiin nopeudelle 100 rpm. Näytteiden annettiin dialysoitua melkein kaksi vuorokautta. Sinä aikana veden pH mitattiin ja milli-Q-vesi vaihdettiin kaksi kertaa dialyysin nopeuttamiseksi. Veden pH mitattiin vielä kolmannen kerran ennen dialyysin lopettamista. Tällöin kaikkien näytteiden dialyysiveden pH oli 5-6, joten näytteiden todettiin dialysoituneen riittävän paljon.

5.1.5 Sonikointi

Näytteet kaadettiin dialyysipussista 100 ml:n tai 250 ml:n dekantterilasiin. Jäähauteena käytettiin jäämurskalla ja vedellä täytettyä 250 ml:n tai 1000 ml:n dekantterilasiasia.

Sonikaattorin (Soniprep 150 Plus, MSE) kärki laitettiin noin 0,5 cm näytteen pinnan alapuolelle ja sen osumista astian reunoihin varottiin. Vetokaapin kansi laskettiin alas ja sonikoidessa käytettiin kuulosuojaimia. Sonikoinnissa käytettiin amplitudia 15,5.

Jokaista näytettä sonikoitiin viisi 7 minuutin jaksoa eli yhteensä 35 minuuttia. Jaksojen välissä suspensiota jäähdytettiin jäähauteessa. Jäähdytys kesti noin minuutin, ja sen aikana näytettä heiluteltiin kevyesti jäähtymisen nopeuttamiseksi.

Suspensiot eivät juuri kuumentuneet sonikoinnin aikana. Toista valmistuserää sonikoidessa dekantterilasi tuntui käteen lämpimältä, muttei kuumalta. Kolmannen valmistuserän dekantterilasi lämpeni selvästi enemmän ja tuntui käteen varsin lämpimältä. Neljäs valmistuserä lämpeni hyvin vähän, vain sen verran, että dekantterilasi ei sonikoinnin jälkeen tuntunut kylmältä. Viidennen valmistuserän ensimmäisen ja viimeisen sonikoinnin aikana dekantterilasi lämpeni melko paljon, mutta kolmen keskimmäisen aikana ei juurikaan.

5.1.6 Hartsipuhdistus

Ioninvaihtohartsia (Sigma, M8157, TMD-8, Mixed Bed Resin hydrogen and hydroxide form, form: gel form, matrix: cross-linked polystyrene (gel)) punnittiin erlenmeyer-pullon pohjalle ja selluloosanäyte pipetoitiin sen päälle. Toista ja kolmatta valmistuserää varten hartsia punnittiin 10 grammaa ja neljättä ja viidettä valmistuserää varten 20 grammaa.

Pullot laitettiin käsivarsiravisteliin (LAB-LINE 3589-1 multi-wrist shaker) siten, että liuos oli koko ajan hieman liikkeessä. Ravistelijan nopeus säädettiin hieman alle kahteen. Suspension annettiin olla kontaktissa ioninvaihtohartsin kanssa 48 tuntia.

5.1.7 Suodatus

Kaikki suspensiot suodatettiin kovetetun, tuhkattoman, kvalitatiivisen suodatinpaperin (Whatman 541) läpi. Toisen valmistuserän suodatus oli nopea ja kesti noin 2–3 minuuttia. Sen sijaan kolmannen, neljännen ja viidennen valmistuserän suodattumisessa kesti kussakin noin puolitoista tuntia. Viidennen valmistuserän suodattuminen oli niin hidasta, että suspensio suodatettiin vain osittain. Selluloosananosuspensioiden määrät ja pitoisuudet on esitetty taulukossa 5.2.

Taulukko 5.2 Nanokiteistä selluloosaa valmistettiin 5 erää. Eri valmistuserissä käytetyt selluloosat hienonnettiin eri tapoja käyttäen. Valmistuseristä saadut selluloosananosuspensioiden määrät ja niiden pitoisuudet on kerrottu taulukossa.

Nanokiteinen selluloosa	Saatu määrä (ml)	Suspension pitoisuus (m-%)
1. erä		
2. erä	27	0,9
3. erä	23	1,2
4. erä	50	0,3
5. erä	140	0,7

Lopuksi suspensioita sentrifugoitiin (4500 rpm) 10 minuutin ajan niiden konsentroiduksi. Konsentroidointi ei kuitenkaan onnistunut, sillä sentrifugointi ei erottanut suspensioista liuksesta, joten konsentraatiot pysyivät ennallaan. Tulos oli odotettu, sillä nanokiteinen selluloosa muodostaa stabiilin suspension jo laimeissa liuksissa.

5.1.8 Gravimetrinen analyysi

Kun nanokiteinen selluloosa oli suodatettu, sen pitoisuus selvitettiin gravimetrisen analyysin avulla. Suspensiota pipetoitiin punnituslaivalle, joka laitettiin huoneenlämmössä pidettyyn eksikaattoriin kuivumaan. Näytteitä punnittiin säännöllisin välein viikon ajan, jotta nähtiin, mihin kunkin näytteen massa asettui. Gravimetristä analyysiä on tehty nanokiteiselle selluloosalle myös kuumentamalla näyte 10–15 minuutiksi 105 °C:seen [57].

Lopullisten nanokiteisten selluloosasuspensioiden konsentraatiot on esitetty taulukossa 5.2. Massaprocentti vaihteli huomattavasti, ja kaikki liukset olivat selvästi

laimeampia kuin artikkelissa [106] saatu 2,4 m-%. Neljännen valmistuserän laimeaa konsentraatiota selittää osittain mustuneiden möykkyjen poistaminen reaktioseoksesta ennen sentrifugointia, mutta muiden erien valmistuksessa ei ollut konsentraatioeroja selittäviä tekijöitä.

Eri selluloosaeristä käytettiin vain toisen erän nanokiteistä selluloosasuspensiota, jonka pitoisuus 0,9 m-% toimi kalvojen valmistuksessa oikein hyvin. Jatkossa nanokiteinen selluloosa kannattaisi valmistaa käyttäen viidennen erän valmistuksessa hyödynnettyä selluloosan hienontamismenetelmää, jossa suodatinpaperi ensin leikattiin saksilla palasiksi, sitten hienonnettiin sauvasekoittimella yhtenäiseksi massaksi ja lopuksi nypittiin märkänä pieniksi hitusiksi. Kalvojen valmistusta varten 0,5 grammaa selluloosaa 9 millilitraan rikkihappoa on sopiva määrä kerralla tehtäväksi: se on helppo määrä käsitellä ja siitä riittää yli kahteenkymmeneen kalvoon.

5.2 Nanokuituisen selluloosan käsittely

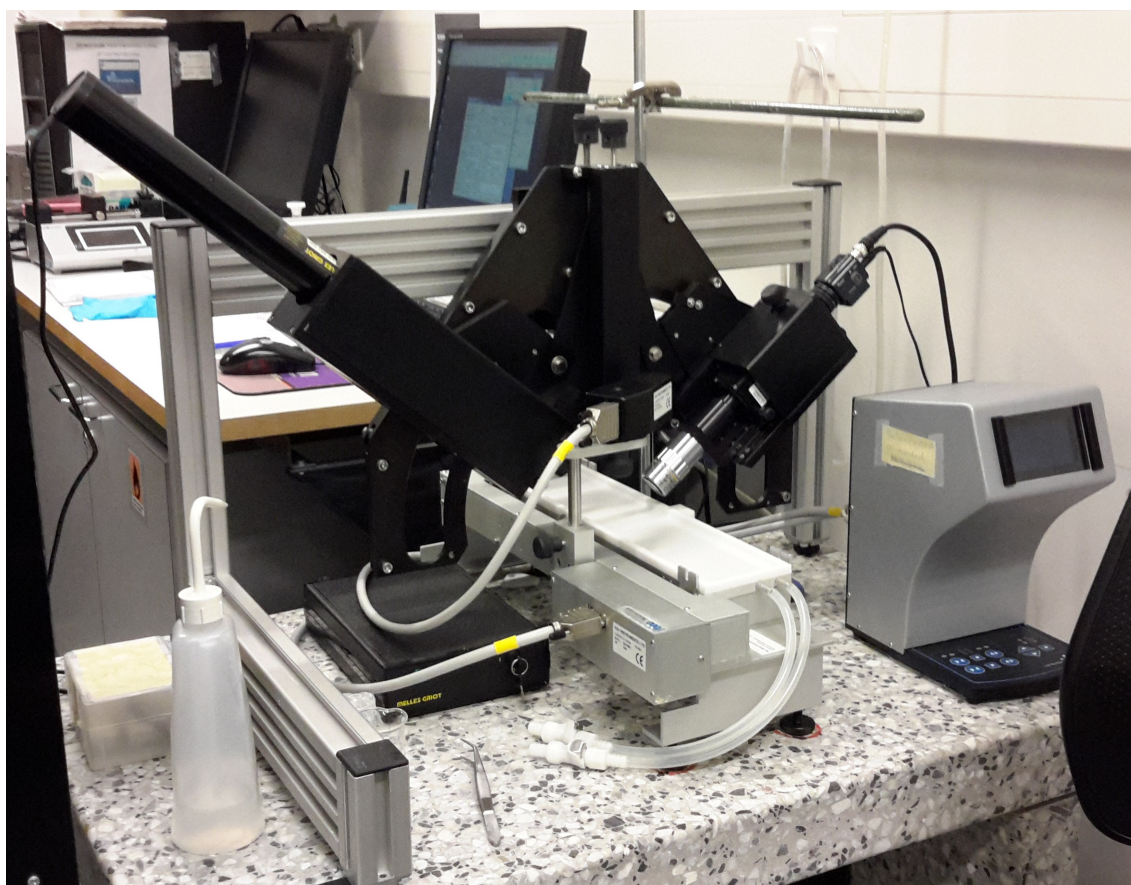
Nanokuituisen selluloosan (Growdex® 1,73 %) ja hapetetun anionisen nanokuituisen selluloosan (0,56 %) vesigeelit oli hankittu UPM-Kymmeneltä. Selluloosa-sulfaattisellua oli muunneltu kemiallisesti, jotta se muodostaisi hapetettua, anionista nanokuituista selluloosaa ([54], [56]). Koska nanokuituisen selluloosan lähdemateriaalina käytettiin koivua, se sisälsi vähän liukoista hemiselluloosaa. Tämä hemiselluloosaosuus aiheutti nanokuituiseen selluloosaan jossain määrin anionista pintavarausta. Hapetetun anionisen nanokuituisen selluloosan korkeampi negatiivinen varaus johtui kuitujen pinnalla olevista karboksyyliyhdistyksistä (karboksyylihappopitoisuus 1,02 mmol/g massaa). [112] Nanokuituisen selluloosan pitoisuus oli 1,6 m-% ja hapetetun anionisen nanokuituisen selluloosan pitoisuus 2,69 m-%.

Nanokuituisesta selluloosasta laimennettiin liuos kalvojen valmistukseen lisäämällä 1 grammaan nanokuituista selluloosaa 2 millilitraan milli-Q-vettä. Anionisen selluloosananokuidun käyttöliuos saatiin laimentamalla 1 gramma anionista selluloosananokuitua 3 millilitraan milli-Q-vettä. Punnituksiin käytettiin Mettler Toledo ME204 -vaakaa.

Liuokset sekoitettiin ensin koeputkiravistelijalla (Vortex - genie touch mixer 1, Scientific Industries), minkä jälkeen niitä toistuvasti imettiin 2 ml:n lääkeruiskuun ja ruiskutettiin takaisin hyvän sekoittumisen varmistamiseksi. Laimennettujen liuosten pitoisuudet olivat nanokuituisella selluloosalla noin 0,5 m-% ja anionisella nanokuituisella selluloosalla noin 0,7 m-%.

5.3 Langmuir-kalvojen valmistus

Kokonaiset isotermit mitattiin puhdastilassa KSV Optrel BAM300 -laitteella, jossa oli kahdella puomilla varustettu 364 x 75 mm:n kokoinen Langmuir-allas (KSV Instruments, LayerBuilder, KSV Minitrough). Brewsterin kulma -mikroskooppilla (BAM, Brewster Angle Microscopy) kuvattiin kalvoa koko isotermin puristuksen ajan. Langmuir-allas ja Brewsterin kulma -mikroskooppi näkyvät kuvassa 5.1.



***Kuva 5.1** KSV Optrel BAM300 -laitteisto, jolla kokonaiset isotermit mitattiin. Mitauksia tehtäessä se oli puhdastilassa muovisuojuksen alla, jotta kontaminaatio olisi mahdollisimman vähäistä. Laitteiston alla oleva pöytä vähentää tärinää. ©Elina Vuorimaa-Laukkanen*

Alafaasina käytettiin pääsääntöisesti milli-Q-vettä (Millipore, Milli-Q Advantage A10). Proteiinimittaukset tehtiin kuitenkin käyttäen alafaasina Dulbeccon fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (10xDPBS) (Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland), josta valmistettiin kaksinkertainen DPBS-liuos milli-Q-veteen. Jatkossa milli-Q-veteen tehtyyn kaksinkertaiseen DPBS-liuokseen viitataan lyhenteellä 2xPBS. Alafaasin lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C.

Isotermeissä ja kalvojen kasvatuksissa puristusnopeus oli pääsääntöisesti 3 mm/min

eli 4,50 cm²/min. Poikkeuksen muodostivat jälleen proteiinimittaukset, joissa puristusnopeus oli 65 mm/min eli 97,50 cm²/min.

Selluloosasuspensiota, jonka pitoisuus oli 0,5 – 0,9 m-%, levitettiin alafaasin pinnalle 500 – 1000 μ l pisara kerrallaan käyttäen lasista mikrolitraruiskua. Nanoselluloosaliuokset pipetoitiin nopeasti samaan paikkaan, sillä suspensio levisi nopeasti alafaasin pinnalle. Kalvon annettiin stabiloitua 5 minuuttia ennen kuin sen päälle pipetoitiin samalla menetelmällä 23 μ l kloroformiin liuotettua DODA:a (Sigma-Aldrich), jonka konsentraatio oli 1,74 mM. Kaikki mitatut isotermit on lueteltu taulukossa 5.3. Systeemin annettiin stabiloitua 15–30 minuuttia, minkä jälkeen sitä alettiin puristaa.

Taulukko 5.3 Taulukossa on esitetty mitattujen isotermien alafaasit, kalvojen muodostamien komponenttien tilavuudet ja vaihe, jossa Ca²⁺-ionit lisättiin alafaasiin.

Alafaasi	DODA	Nanoselluloosa	Ca ²⁺ / Proteiini
milli-Q	18 μ l		
milli-Q	23 μ l	kiteinen, 1 ml	
milli-Q		kiteinen, 1 ml	
milli-Q	23 μ l	anioninen kuitu, 1 ml	
milli-Q	23 μ l	anioninen kuitu, 750 μ l	
milli-Q	23 μ l	anioninen kuitu, 500 μ l	
milli-Q		anioninen kuitu, 750 μ l	
milli-Q	23 μ l	kuitu, 750 μ l	
milli-Q	23 μ l	kiteinen, 1 ml	Ca ²⁺ -lisäys alussa
milli-Q	23 μ l	kiteinen, 1 ml	Ca ²⁺ -lisäys 30 mN/m
2xPBS	23 μ l	kiteinen, 1 ml	
2xPBS		kiteinen, 1 ml	laminiini, 1800 μ l
2xPBS		kiteinen, 1 ml	kollageeni 1, 180 μ l
2xPBS		kiteinen, 1 ml	kollageeni 4, 180 μ l

Proteiinikalvokokeita varten samalla tavoin pipetoidun nanoselluloosaliuoksen annettiin stabiloitua 5 minuuttia ennen kuin sen päälle pipetoitiin nopeasti eri paikkoihin proteiinin vesiliuosta (kollageenit Sigma-Aldrich, laminiini Biolamina LN521, BioLamina, Ruotsi), jonka konsentraatio oli 0,1–1,0 mg/ml. Ennen kalvon puristamista systeemin annettiin stabiloitua 30–180 minuuttia.

5.4 Langmuir-Schaeffer-kalvojen valmistus

LS-kalvot valmistettiin käyttäen KSV Minitrough -systeemiä, joka on esitetty aiemmin kuvassa 2.11. Langmuir-kalvot valmistettiin samalla menetelmällä kuin isotermitkin. Kalvo puristettiin haluttuun pintapaineeseen, jossa kalvon kasvatus tehtiin. LS-kalvoja puristettiin symmetrisesti molemmilta puolilta alafaasin pinnan suuntaisesti.

Eri tarkoituksia varten käytettiin useita eri substraatteja. SEM-mittauksia varten kalvot kasvatettiin pii-levyille, AFM-mittauksia varten vastapuhdistetulle kiilteelle (mica), IR-mittauksiin kvartsille ja vasta-ainevärjäystä varten kalvot kasvatettiin peitelasille.

Pii-levyt oli huuhdeltu 2-propanolilla, minkä jälkeen niitä oli pesty ultraäänihauhteessa 2 minuuttia 2-propanoliin upotettuina. Levyt oli huuhdeltu kloroformilla ja kuivattu typpisuihkulla. Kvartsi-levyjen oli annettu olla yön yli 2 % Hellmanex III -liuoksessa, minkä jälkeen ne oli huuhdeltu 10 kertaa milli-Q-vedellä. Niitä oli pesty ultraäänihauhteessa ensin 30 minuuttia asetoniin ja sitten 30 minuuttia 2-propanoliin upotettuina. Lopuksi ne oli kuivattu 150 °C:ssa uunissa tunnin ajan. Peitelaseja oli pesty ultraäänihauhteessa 10 minuuttia 2-propanoliin upotettuina. Lasit oli huuhdeltu kloroformilla ja kuivattu typpisuihkulla.

LS-kalvot siirrettiin substraateille manuaalisesti kosketa-ja-nosta -menetelmää käyttäen. Kasvatetut LS-kalvot kuivattiin typpisuihkulla. 2xPBS-suolaliuosta alafaasina käyttäen kasvatetut proteiininäytteet pestiin kahdesti milli-Q-vedellä, jotta suolaki-teet saatiin poistettua niiden pinnalta. Niiden annettiin kuivua eksikaattorissa vuorokausi ennen kuin ne kuvattiin uudelleen.

5.5 Kalvojen analysointi

Siirtosuhteiden laskemista varten substraateista piirrettiin hahmotelmat ruutupaperille ja substraatin mittojen avulla arvioitiin sen pinta-ala. Koska osa substraateista oli epäsäännöllisen muotoisia, pinta-alojen arviointi ei ollut erityisen tarkka. Kasvatetuille kalvoille laskettiin siirtosuhteet kaavalla 2.3. Lasketut siirtosuhteet on listattu taulukossa 5.4.

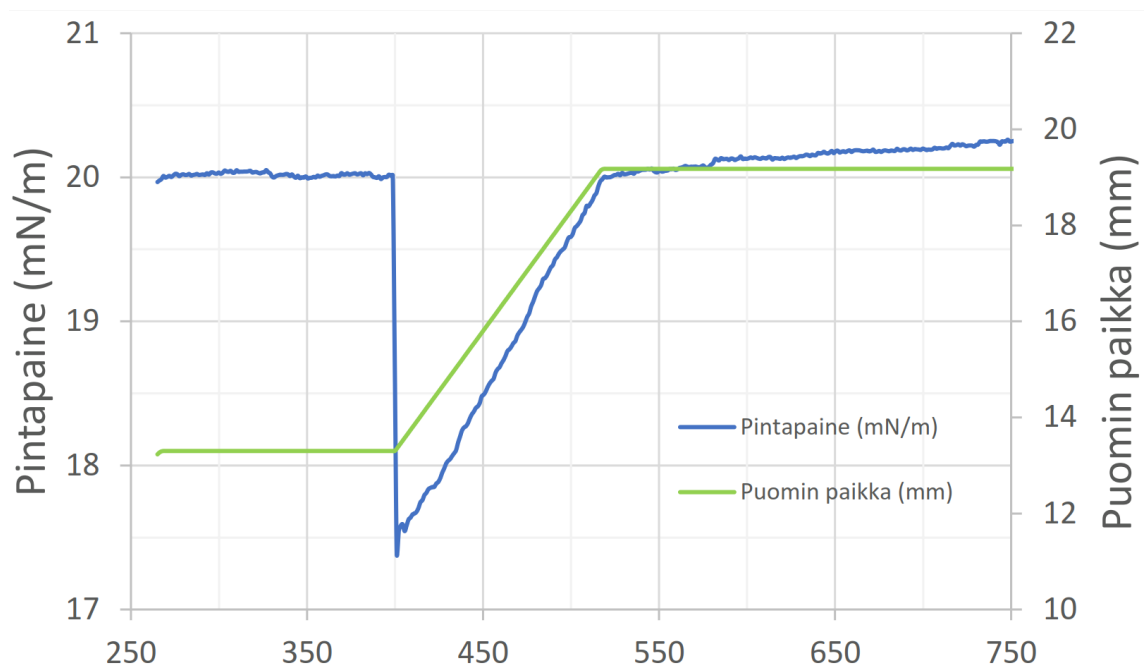
Taulukko 5.4 Kuudelle näytteelle lasketut siirtosuhteet: DODA + kiteinen nanoselluloosa, DODA + selluloosananokuitu ja DODA + anioninen selluloosananokuitu, joista kukin sekä pintapaineessa 25 mN/m että 40 mN/m.

Näyte	Pintapaine (mN/m)	Siirtosuhte
Kiteinen	25	1,6
Kiteinen	40	2,3
Kuitu	25	1,5
Kuitu	40	1,6
Anioninen kuitu	25	1,6
Anioninen kuitu	40	2,4

Saadut siirtosuhteiden arvot ovat alaluvun 2.2.4 viitearvoihin verrattuna erittäin huonoja. Viitearvot on kuitenkin tarkoitettu amfifileistä valmistetuille LB-kalvoille,

ja tässä työssä on kasvatettu polymeerikalvoja LS-menetelmällä. LS-menetelmällä kasvatettujen kalvojen siirtosuhteet eivät ole yhtä säännöllisiä kuin LB-menetelmällä kasvatetuilla kalvoilla, eikä ideaaliarvosta 1 poikkeava arvo välttämättä tarkoita kasvatuksen epäonnistumista. Koska saadut siirtosuhteet ovat kaikki yli yhden, kalvoa on tarttunut substraatin pinnalle enemmän kuin substraatin pinta-alan verran. Luultavasti substraatin reunan yli menneet polymeeriketjut ovat nousseet substraatin mukana alafaasin pinnalta, mikä aiheuttaa siirtosuhteen suurenemisen.

Kuvassa 5.2 on esitetty esimerkinomaisesti yksi kasvatuskuvaajista. Koska ohjelmistossa ei ollut automaattista systeemiä, katsottiin kuvaajasta, paljonko puomit olivat liikkuneet, kunnes pintapaine oli taas tasapainottunut kasvatuspaineeseen.



Kuva 5.2 DODA:n ja nanokiteisen selluloosan kasvatuskuvaaja.

Kuvassa 5.1 näkyvässä BAM-instrumentissa oli 10 mW HeNe-laser (Melles Griot), jonka aallonpituus oli 633 nm. Valo polarisoitiin lineaarisesti valon tulotasossa Glan-Thompson-polarisaattorilla. Rajapinnasta tullessaan heijastuma kulki toisen Glan-Thompson-polarisaattorin läpi, ja CCD-kamera kuvasi sen. Mikroskooppi säädettiin siten, että puhtaan alafaasin ilma-vesi-rajapinnasta tuleva taustaheijastuma oli mahdollisimman pieni. Menetelmän paikkaresoluutio oli noin $2\ \mu\text{m}$.

Nanokiteisen selluloosan ja DODA:n sekä pelkän DODA:n muodostamat kalvot kuvattiin infrapunaspektroskoopilla (IR-spektroskooppi). Mittausdata oli kuitenkin epätarkan näköistä, eikä sitä ole esitetty ollenkaan. Suurin hyöty mittauksista oli, että spektreistä nähtiin, että kvartsin pinnalle oli todellakin muodostunut kalvo.

Pyyhkäisyelektronimikroskopia (Scanning Electron Microscopy, SEM) mahdollistaa erilaisten kalvojen kuvaamisen suurella resoluutiolla [103]. Koska mittaus tehdään suuressa alipaineessa, kalvojen on oltava kuivia, mikä vaikeuttaa toisinaan biologisten näytteiden kuvaamista. Kuvaamisen helpottamiseksi näyte voidaan päällystää raskasmetallilla, esimerkiksi kullalla tai platinalla. [3]

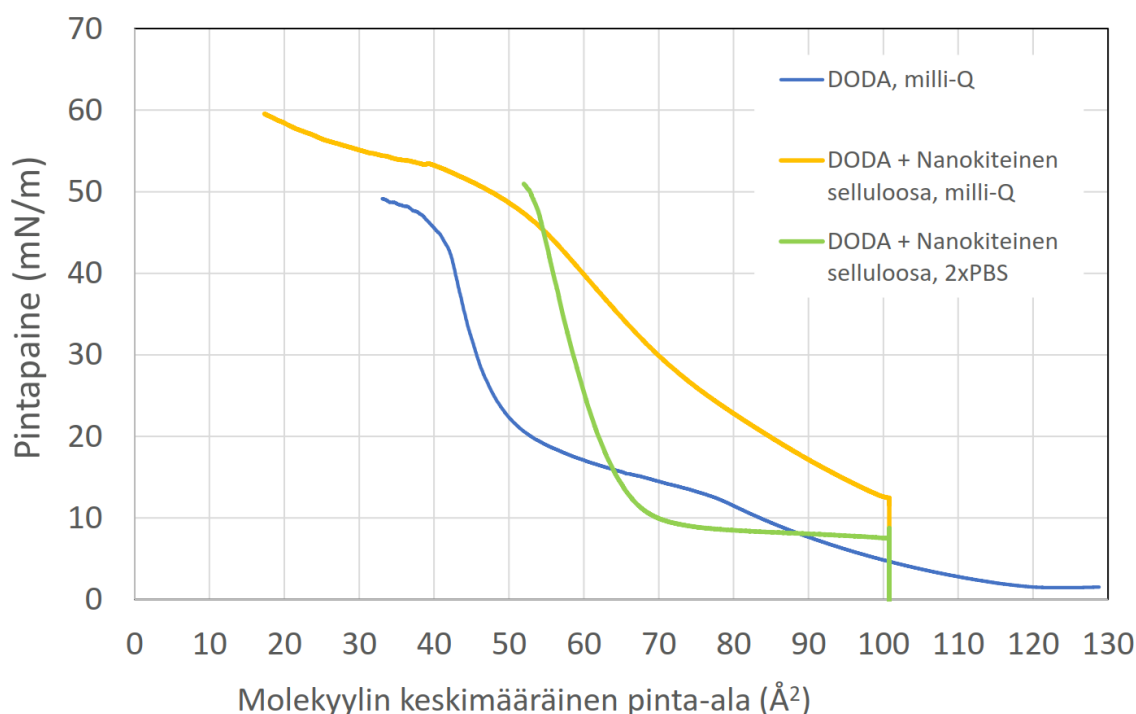
Pyyhkäisyelektronimikroskoopin (SEM Zeiss Ultra 55) kiihdytysjännitteenä käytettiin 0,5–2,0 kV ja näytteistä kuvattiin 200–100 000-kertaisia suurennoksia. Näytteet kuvattiin ensin sellaisenaan. Johtavuuden lisäämiseksi osa niistä pinnoitettiin platinalla (Quorum Q150TS, Quorum Technologies, UK, pinnoitusaika 25 s), minkä jälkeen ne kuvattiin uudestaan. Proteiininäytteet kuvattiin ensin sellaisinaan ja toiseen kertaan pesun jälkeen.

Atomivoimamikroskopiassa (Atomic Force Microscopy, AFM) anturin kärkeä liikutellaan pinnan läheisyydessä ja anturin ja pinnan väliset vuorovaikutukset mitataan. Tuloksena saadaan tietoa näytteen pinnanmuodoista. AFM:n etu on, että se ei vaadi tyhjiötä eikä johtavaa näytettä. Sillä saadaan muodostettua hyvin tarkkaa kuvaa, mutta tutkittava alue on erittäin pieni ($100\text{ }\mu\text{m}^2$ – 1 mm^2). [3]

Jokainen näyte kuvattiin kahdella eri suurennoksella (kuvan koko $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ ja $30\text{ }\mu\text{m} \times 30\text{ }\mu\text{m}$) käyttäen pyyhkäisynopeutta 1 Hz. Mittaukset tehtiin tapping mode -tilassa ilmassa kärkikannakkeella μmasch (HQ:NSC15/Al BS). Kärjen resonanssitaajuus oli 325 kHz, voimavakio 40 N/m ja säde 8 nm. Anturin materiaali oli n-tyypin pii, jonka tausta oli päällystetty alumiinilla. Mittauksiin käytettiin Veeco Dimension 5000 -skannausanturimikroskooppia, jossa oli Nanoscope V -säädin (Digital Instruments, Inc.). Kuvat litistettiin mahdollisten kuvausdatan kallistumien poistamiseksi, mutta niitä ei käsitelty muuten. Kuvankäsittelyyn ja analysointiin käytettiin ohjelmaa Nanoscope Analysis 1.5.

6. TULOKSET

Kalvojen valmistaminen aloitettiin mittaamalla vertailunäytteeksi pelkän DODA:n isotermi käyttäen alafaasina milli-Q-vettä. DODA:n 1,74 mM kloroformi-liuosta pipetoitiin alafaasin pinnalle 18 μl , jolloin yhden DODA-molekyylin keskimääräinen pinta-ala ennen puristusta oli 128,82 \AA^2 . DODA:n isotermi on esitetty kuvassa 6.1.

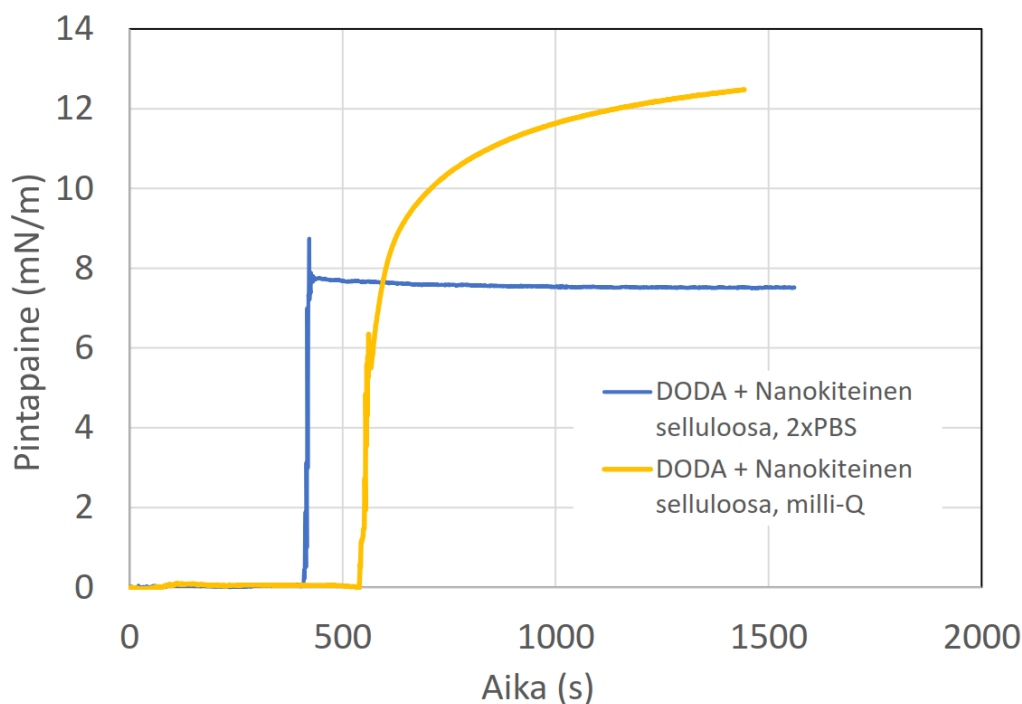


Kuva 6.1 Pelkän DODA:n (milli-Q-vesi alafaasina), DODA:n ja nanokiteisen selluloosan (milli-Q-vesi alafaasina) ja DODA:n ja nanokiteisen selluloosan (2xPBS-liuos alafaasina) isotermit, pintapaine (mN/m) DODA-molekyylin keskimääräisen pinta-alan (\AA^2) funktiona. Alafaasin lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C. Pelkän DODA:n isotermissä DODA:a pipetoitiin 18 μl , mutta kaikissa muissa isotermeissä sitä käytettiin 23 μl . Pelkän DODA:n isotermissä sen pipetoitu määrä vaikuttaa lähinnä vain isotermin aloituspaikkaan. DODA:n ja nanokiteisen selluloosan isotermi (2xPBS-liuos alafaasina) on katkaistu kalvon mentyä kollapsiin.

Pelkän DODA:n pipetoinnin aikana pintapaine nousi nopeasti 1,5 mN/m:iin ja stabiloitui siihen. Pintapaine ei noussut enää sen jälkeen, joten stabilointikuvaajaa ei ole erikseen esitetty. Pelkän DODA:n isotermi nousee hitaasti pintapaineeseen 10

mN/m asti ja vaikuttaa olevan laajentunut neste -faasissa. Pintapaineen 10 mN/m kohdalla isotermissä näkyy molekyylien uudelleenjärjestäytyminen, jonka jälkeen isotermi nousee suunnilleen samalla nopeudella pintapaineeseen 20 mN/m, jossa se on hetkellisesti tiivistynyt neste -faasissa. Sieltä pintapaine nousee nopeasti kiinteässä faasissa 45 mN/m:iin, jossa kalvo menee kollapsiin.

Kalvojen valmistamista jatkettiin soveltamalla kirjallisuudesta löydettyä menetelmää [1]. Aiemmin nanokiteinen selluloosa oli laitettu alafaasiin, mutta nyt se pipetoitiin alafaasin pinnalle. Kiteistä nanoselluloosaa pipetoitiin 1 ml nopeasti yhteen paikkaan, minkä jälkeen sen annettiin stabiloitua 5 minuuttia ennen DODA:n lisäämistä. Nanokiteisen selluloosan lisääminen vaikutti pintapaineeseen hyvin vähän: pintapaine kasvoi noin 0,1 mN/m puhtaaseen milli-Q-veteen verrattuna. Kun DODA lisättiin, pintapaine nousi heti yli 5 mN/m ja jatkoi 15 minuutin stabiloinnin aikana nousua 10–15 mN/m:in. Stabilointikuvaaja on piirretty kuvaan 6.2. Sopivaksi DODA:n määräksi laskettiin aiemman tutkimuksen [1] perusteella 23 μl , jolloin yhden DODA-molekyylin keskipinta-ala ennen puristusta oli 100,81 \AA^2 .



Kuva 6.2 DODA:n ja nanokiteisen selluloosan stabiloituminen, pintapaine (mN/m) ajan funktiona. Alafaasina oli toisessa isotermissä milli-Q-vesi ja toisessa 2xPBS-liuos. Alafaasin lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C. Kuvaaja alkaa nanokiteisen selluloosan pipetoinnilla, mutta siitä aiheutuva pintapaineen nousu on niin pieni, ettei se näy kuvaajassa. Pintapaine nousi selvästi, kun DODA pipetoitiin kiteisen nanoselluloosan muodostaman kalvon pinnalle. 2xPBS-kalvon pinnalle DODA pipetoitiin noin 400 sekunnin kohdalla ja milli-Q-alafaasin pinnalle vähän 500 sekunnin jälkeen.

Nanokiteisen selluloosan määrä arvioitiin siten, että sitä oli DODA-molekyyleihin verrattuna selvästi ylimäärin. Koska määrä todettiin käytännössä toimivaksi ja nanokiteistä selluloosaa oli riittävän paljon, määrää ei yritetty muuttaa. DODA:n ja nanokiteisen selluloosan isotermi on esitetty kuvassa 6.1. Proteiini-isotermien alafaasina käytettiin 2xPBS-liuosta, joten niiden vertailunäytteeksi mitattiin DODA:n ja nanokiteisen selluloosan isotermi 2xPBS-liuosta alafaasina käyttäen. Isotermi on esitetty kuvassa 6.1.

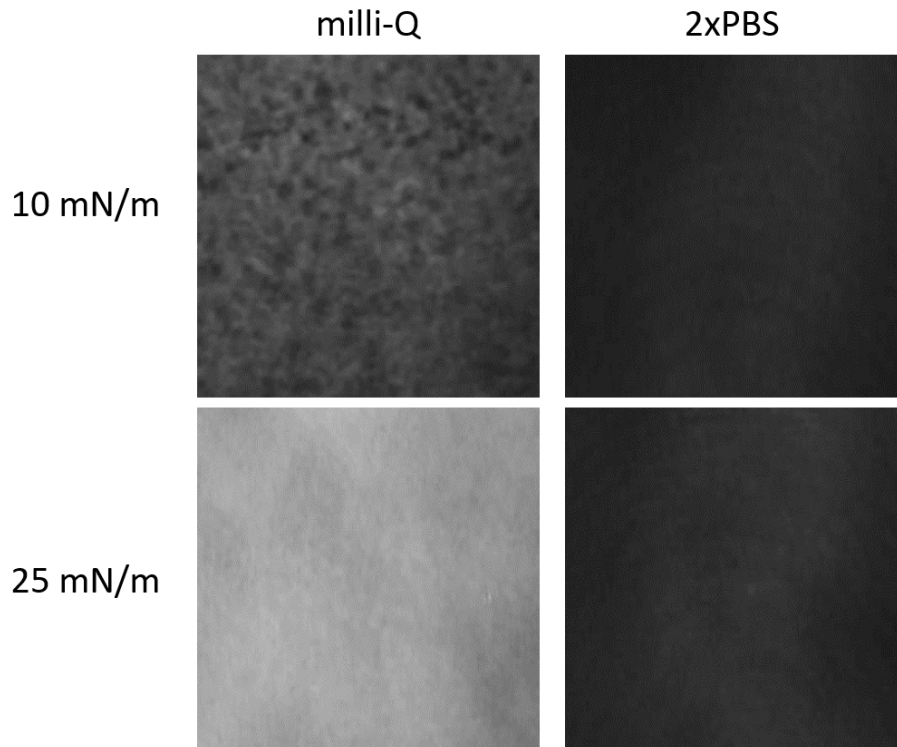
Kuvassa 6.2 esitetty stabilointikuvaaja alkaa nanokiteisen selluloosan pipetoinnilla, mutta siitä aiheutuva pintapaineen nousu on niin pieni, ettei se näy kuvaajassa. Pintapaine nousi selvästi, kun DODA pipetoitiin kiteisen nanoselluloosan muodostaman kalvon pinnalle. Alafaasi vaikuttaa kalvon stabiloitumiseen huomattavasti. Milli-Q-vettä alafaasina käytettäessä pintapaine jatkoi nousuaan vielä selvästi DODA:n pipetoinnin jälkeen. Kun alafaasina oli 2xPBS-liuos, pintapaine nousi heti pipetoinnin aikana korkeimpaan arvoonsa ja laski siitä stabiloinnin aikana vähän.

DODA:n ja nanokiteisen selluloosan isotermi, kun alafaasina on milli-Q-vesi, alkaa kaikkein suurimmasta pintapaineesta, mutta sen pintapaine myös nousee alussa paljon nopeammin kuin kahden muun isotermien. Isotermistä erottuu vain laajentunut neste -faasi. Pintapaine nousee tasaisesti, kunnes kalvo menee kollapsiin. Kollapsi on laakea ja alkaa pintapaineessa 45 mN/m, jossa DODA menee kollapsiin.

DODA:n ja nanokiteisen selluloosan isotermi, kun alafaasina on 2xPBS-liuos, käyttäytyy aluksi kaasufaasin tavoin ja nousee todella hitaasti ennen kuin se saavuttaa pintapaineen 10 mN/m. Sen jälkeen pintapaine nouseekin erittäin nopeasti kiinteässä faasissa pintapaineeseen 45 mN/m, jossa kalvo menee kollapsiin.

Stabiloinnin ja puristuksen aikana kalvon muodostumista seurattiin BAM:lla. Kuvassa 6.3 on esitetty nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostamat kalvot pintapaineissa 10 mN/m ja 25 mN/m. Pintapaineessa 10 mN/m kalvon stabiloituminen oli vielä kesken ja pintapaineessa 25 mN/m kalvoa puristettiin. Myös pelkän DODA:n muodostamasta kalvosta saatiin kuvia, mutta koska ne ovat hyvin tummia, niitä ei ole otettu mukaan tähän vertailuun. Pelkän DODA:n muodostaman kalvon kuvat on esitetty myöhemmin kuvassa 6.8.

Kuten BAM-kuvista kuvassa 6.3 näkyy, nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostama kalvo milli-Q-veden pinnalla muodosti 10 mN/m:n pintapaineessa rakeisen pintarakenteen, mutta kalvo oli vielä melko ohut. 25 mN/m:n pintapaineessa kalvo oli varsin tasainen ja melko paksu. Nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostama kalvo 2xPBS-liuoksen pinnalla oli ohut. Kuvat olivat tummia eikä niissä erottunut minkäänlaista pintarakennetta. Suuremmissa pintapaineissa 2xPBS-



Kuva 6.3 Nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostama kalvo kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla pintapaineissa 10 mN/m ja 25 mN/m. Alafaaseina käytettiin milli-Q-vettä ja 2xPBS-liuosta. Kuvia on vaalennettu siten, että niiden valkoisuusaste on 200, ja rajattu niin, että kuvan koko on $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$. Pintapaineessa 10 mN/m kalvon stabiloituminen oli vielä kesken ja pintapaineessa 25 mN/m kalvoa puristettiin.

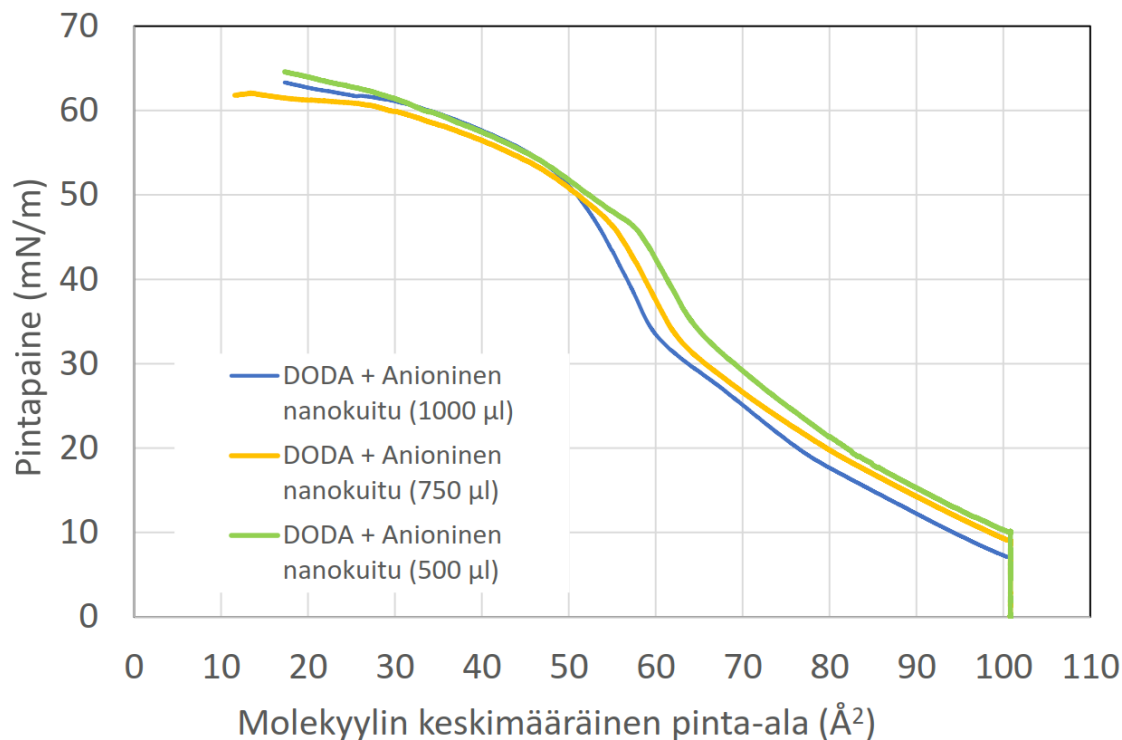
liuoksen BAM-kuvissa näkyi heikko häivähdys harmaata kuten pelkän DODA:nkin muodostamissa kalvoissa.

Kaikki kolme kalvoa näyttivät tasaisilta eikä lauttojen muodostumista havaittu missään isotermin vaiheessa. DODA:n muodostama kalvo milli-Q-veden pinnalla ja DODA:n ja nanokiteisen selluloosan muodostama kalvo 2xPBS-liuoksen pinnalla olivat molemmat koko ajan hyvin tummia, eikä niissä erottunut mitään epätasaisuutta. DODA:n ja nanokiteisen selluloosan muodostama kalvo milli-Q-veden pinnalla oli kokonaisuudessaan tasaisesti jakautunut alafaasin pinnalle. Stabiloinnin aikana pinnan hienorakenne oli hieman rakeinen, mutta se tasaantui jo stabiloinnin aikana. Isotermin puristuksen aikana kalvo oli täysin tasainen.

6.1 Nanokuituiset selluloosat

Kun kiteisestä nanoselluloosasta oli DODA:n avulla saatu mitattua ja kuvattua onnistunut isotermin, sama kokeiltiin toistaa anionisella selluloosananokuidulla. Sen

ajateltiin pintavarauksensa takia nousevan kationisen DODA:n houkuttelemana alafaasin pinnalle helpommin kuin vain heikosti varautuneen selluloosananokuidun. Alafaasina käytettiin milli-Q-vettä. Anionista selluloosanasuspensiota pipetoitiin alafaasin pinnalle 1 ml ja sen annettiin stabiloitua 5 minuuttia ennen DODA:n lisäämistä kuten nanokiteisenkin selluloosan. Anioninen selluloosananokuitu nousi pintaan, pintapaine kasvoi odotetulla tavalla ja isotermin mittaus onnistui. Anionisen nanokuituisen selluloosan isotermin esitetty kuvassa 6.4.



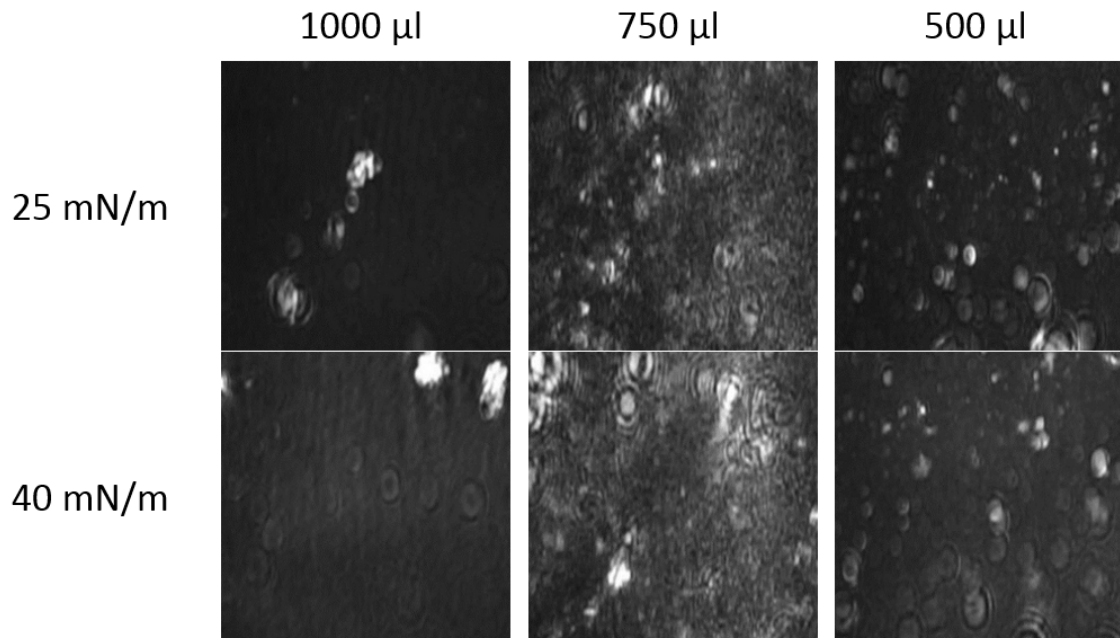
Kuva 6.4 Anionisen selluloosananokuidun isotermit kolmelle eri pipetointimäärälle, pintapaine (mN/m) DODA-molekyylin keskimääräisen pinta-alan (Å²) funktiona. Alafaasina kaikissa mittauksissa oli milli-Q-vesi, jonka lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C.

Koska nanokuituista selluloosaa oli käytettävissä rajoitettu määrä, kalvonmuodotukseen tarvittava selluloosanasuspension määrä pyrittiin optimoimaan. Anionisesta nanokuituisesta selluloosasta kokeiltiin tehdä kalvoja käyttäen kolmea eri selluloosasisuspension tilavuutta: 1000 µl, 750 µl ja 500 µl. Anioninen nanokuituinen selluloosa stabiloitui lähes samalla tavalla kuin kiteinen nanoselluloosa, mutta se saavutti tasapainon huomattavasti nopeammin.

Isotermit DODA:lle ja eri määrille anionista selluloosananokuitua on esitetty kuvassa 6.4. Kuvaajasta nähdään, että pipetoidun nanoselluloosasisuspension määrä vaikuttaa stabiloinnin jälkeiseen alkupintapaineeseen. Kuvaajat ovat varsin samanmuotoisia ennen kuin ne kaikki menevät kollapsiin pintapaineessa 45 mN/m kuten

kiteinenkin nanoselluloosa. 500 μl anionista selluloosaa muodostaa hieman loivemman isotermin kuin kaksi suurempaa tilavuutta. 1000 μl :n ja 750 μl :n isotermeissä nousu noin 30 mN/m:n pintapaineesta kollapsiin on yhtä jyrkkä.

Kuvassa 6.5 esitetyistä BAM-kuvista nähtiin, että 500 μl anionista selluloosananokuitua ei riitä, sillä kalvoon jäi vielä suurillakin pintapaineilla tummia, ohuempia alueita kirkkaina pisteinä näkyvien hyvin muodostuneiden kalvolautojen väliin ja kalvon järjestäytyminen näytti olevan kesken. BAM-kuvien perusteella sekä 1000 μl että 750 μl anionista nanoselluloosaa muodostivat yhtenäisen kalvon. Koska anionista selluloosananokuitua oli rajoitetusti ja 750 μl riitti onnistuneeseen kalvonmuodotukseen, 750 μl todettiin selkeimmän isotermin ja hyvien BAM-kuvien perusteella sopivimmaksi määräksi anionista selluloosananokuitua.



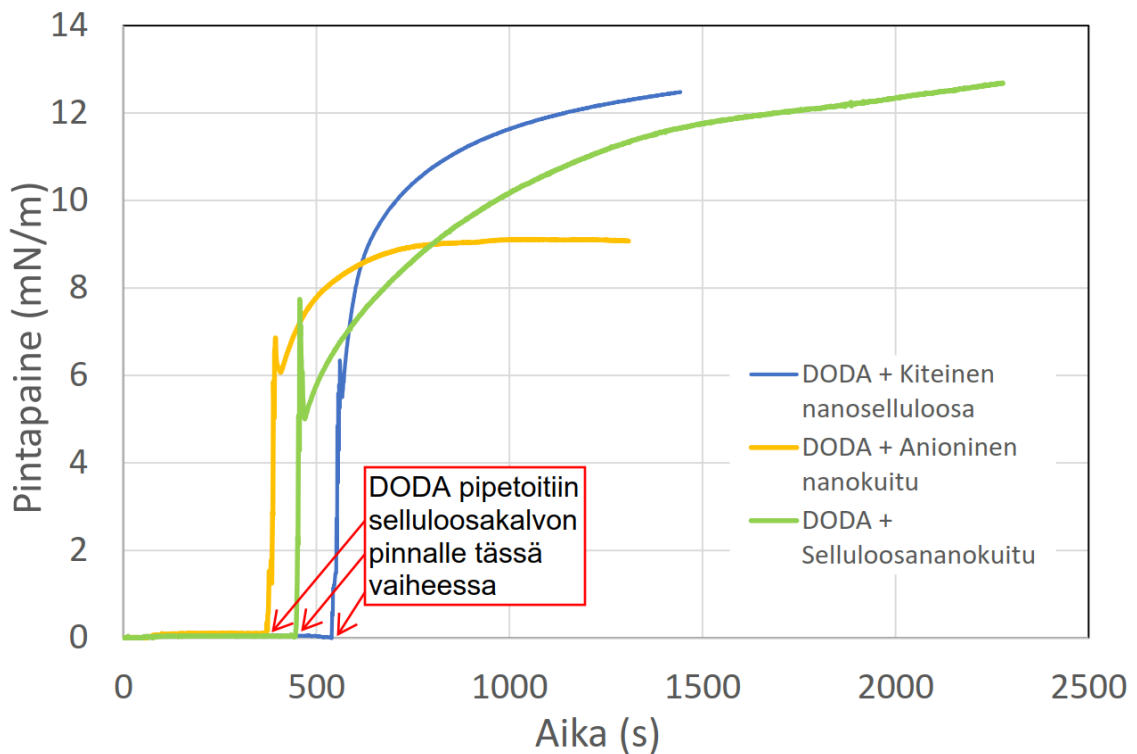
Kuva 6.5 Anionisen selluloosananokuidun ja DODA:n muodostama kalvo kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla pintapaineissa 25 mN/m ja 40 mN/m eri pipetointimäärillä. Kuvia on vaalennettu siten, että niiden valkoisuusaste on 200, ja rajattu niin, että kuvan koko on 200 μm x 200 μm . Anionista selluloosananokuitua kokeiltiin kolme eri määrää: 1000 μl , 750 μl ja 500 μl . Vasemmanpuoleisessa (1000 μl) ja keskimäisessä kuvaparissa (750 μl) anionista selluloosananokuitua on tarpeeksi ja pintapaineessa 40 mN/m BAM-kuvissa näkyy selvästi pystysuuntaista järjestäytymistä. Oikeanpuoleisessa kuvaparissa (500 μl) liuosta on liian vähän, jolloin kunnollista pintaa ei muodostu.

Kaikki kolme tilavuutta anionista selluloosananokuitua muodostavat epätasaisen kalvon, kun taas kiteisen nanoselluloosan muodostama kalvo on hyvin tasainen. 500 μl kalvo on laikukas eikä ohuemmilla alueilla näy kalvon minkäänlaista suuntautumista. Tilavuuksilla 1000 μl ja 750 μl pintapaineessa 40 mN/m BAM-kuvissa sen sijaan näkyy selvästi pystysuuntaista järjestäytymistä. Kuvaan nähden puomit

lähestyivät toisiaan kuvan sivuilta, eli kalvon suuntautuneisuus on kohtisuorassa puomien liikesuuntaan nähden.

Nanokiteisellä selluloosalla ja anionisella selluloosananokuidulla kokeiltiin kummallakin kalvon muodostamista ilman DODA:a milli-Q-alafaasin pinnalle. Kummankaan nanoselluloosan isotermissä pintapaine ei noussut yli $0,25 \text{ mN/m:n}$ ja nanokiteisellä selluloosalla pintapaine jäi alle $0,1 \text{ mN/m:iin}$. Voidaan siis päätellä, että nanoselluloosa vaatii alafaasin pinnalle jonkun muun aineen, esimerkiksi DODA:n, pitämään sen alafaasin pinnalla. DODA-molekyylit ovat positiivisesti varautuneita ja selluloosamolekyyleissä on negatiivista varausta tai osittaisvarausta, joten niiden välillä on coulombisten voimien aiheuttamaa attraktiota.

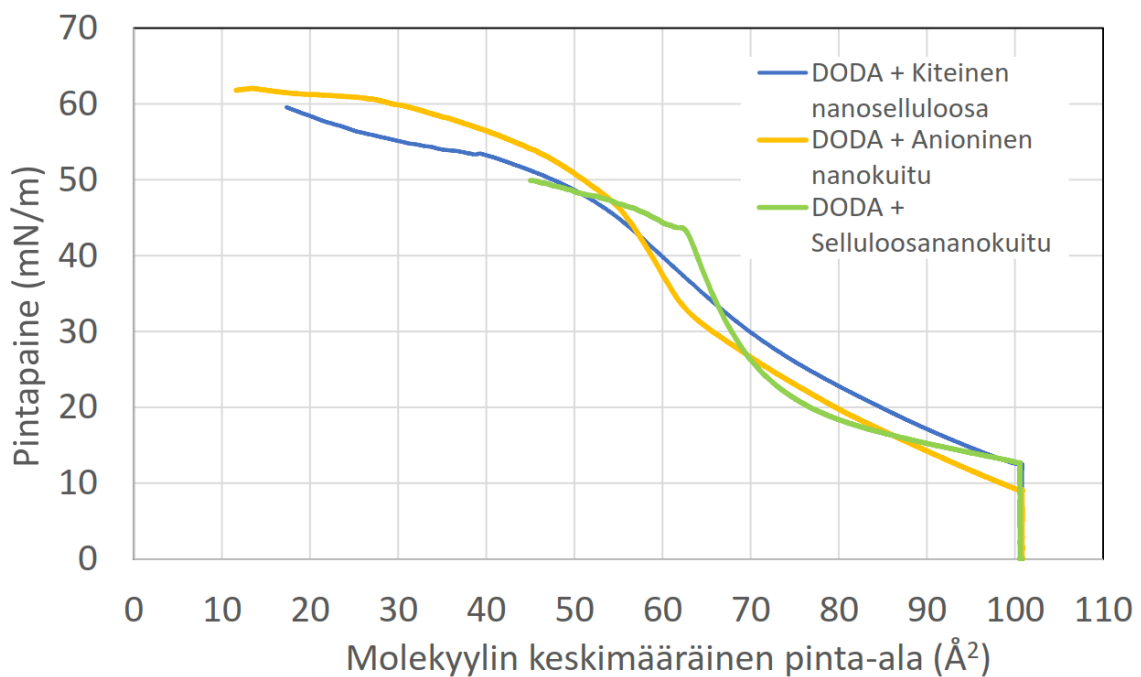
Selluloosananokuidusta mitattiin isotermi samalla menetelmällä kuin anionisestakin selluloosananokuidusta käyttäen hyväksi havaittua selluloosananokuitususpension $750 \mu\text{l:n}$ tilavuutta. Huomattiin, että selluloosananokuitumittauksissa alafaasi haihtui herkemmin Langmuir-altaasta kuin nanokiteisellä tai anionisella nanokuituisella selluloosalla. Selluloosananokuidun havaittiin myös vaativan pidemmän stabilointiajan kuin anioninen selluloosananokuitu, kuten voi nähdä kuvasta 6.6.



Kuva 6.6 Kiteisen nanoselluloosan, anionisen selluloosananokuidun ja selluloosananokuidun stabiloituminen, pintapaine (mN/m) ajan (s) funktiona. Alafaasina kaikissa mittauksissa oli milli-Q-vesi, jonka lämpötila oli $21,2 \pm 0,6^\circ \text{C}$.

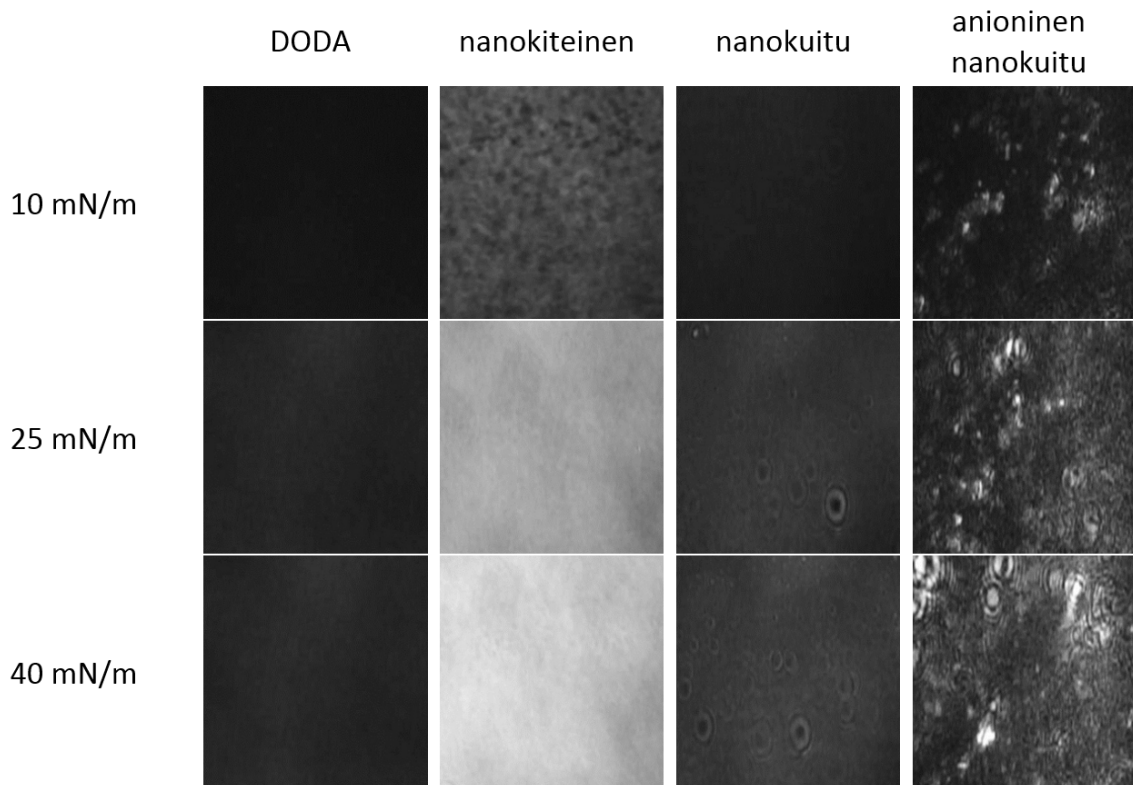
Stabilointikuvaajista nähdään, että anioninen selluloosananokuitu stabiloitui erittäin hyvin 15 minuutissa, mutta selluloosananokuidun pintapaine nousi 15 minuutin stabiloinnin jälkeen vielä huomattavasti, joten sen annettiin stabiloitua 30 minuuttia. Myös nanokiteinen selluloosa olisi voinut hyötyä pidemmästä stabilointiajasta, vaikka sen stabiloituminen ei ollutkaan 15 minuutin jälkeen yhtä pahasti kesken kuin selluloosananokuidulla.

Kaikkien kolmen nanoselluloosamateriaalin isotermit on esitetty kuvassa 6.7. Kuvaajasta nähdään, että kiteisen nanoselluloosan isotermi on muodoiltaan melko loiva kahteen muuhun isotermiin verrattuna. Anionisen selluloosananokuidun isotermi alkaa samanmuotoisena kuin kiteisellä nanoselluloosalla, kunnes se pintapaineessa 30 mN/m alkaa nousta paljon jyrkemmin. Selluloosananokuidun isotermi nousee paljon loivemmin pintapaineeseen 20 mN/m, minkä jälkeen se nousee jyrkästi ja nopeasti pintapaineeseen 45 mN/m, jossa se menee kollapsiin. Selluloosananokuidun pintapaine ei noussut yli 50 mN/m, mutta sekä nanokiteisen että anionisen nanokuituisen selluloosan pintapaine nousi 60 mN/m:iin.

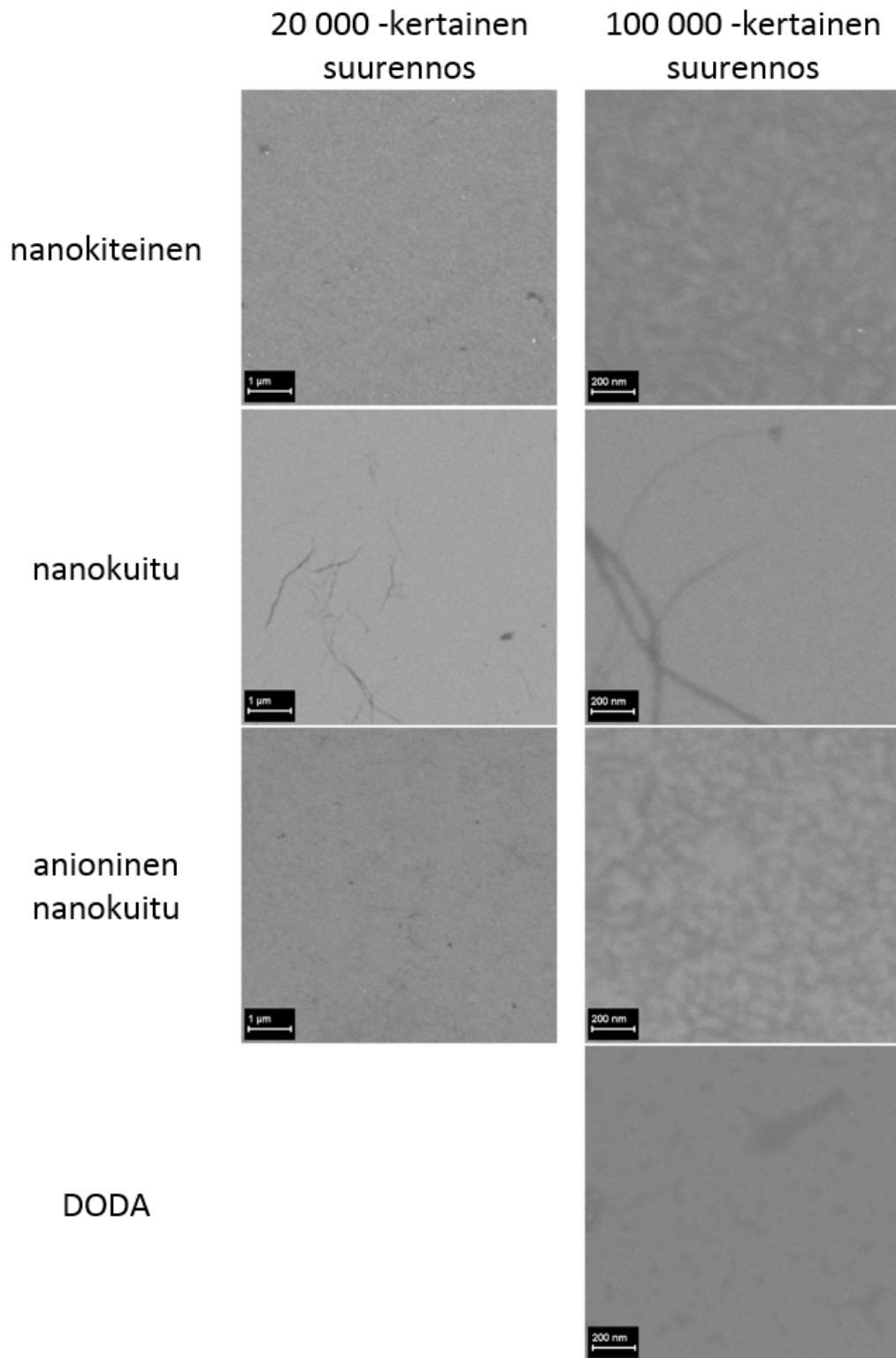


Kuva 6.7 Kiteisen nanoselluloosan, anionisen selluloosananokuidun ja selluloosananokuidun isotermit, pintapaine (mN/m) DODA-molekyylin keskimääräisen pinta-alan (Å²) funktiona. DODA pipetoitiin, kun nanoselluloosa oli stabiloitunut 5 minuuttia. Stabilointikuvaajat on esitetty kuvassa 6.6. Selluloosananokuidun isotermi on katkaistu hiukan sen jälkeen, kun se meni kollapsiin. Alafaasina kaikissa mittauksissa oli milli-Q-vesi, jonka lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C.

Kuvassa 6.8 on esitetty pelkän DODA:n, nanokiteisen selluloosan ja DODA:n, selluloosananokuidun ja DODA:n sekä anionisen selluloosananokuidun ja DODA:n muodostamat kalvot kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla pintapaineissa 10 mN/m, 25 mN/m ja 40 mN/m. Niistä näkyy, miten pelkän DODA:n muodostamat kalvot ovat niin ohuita, että BAM-kuvat ovat täysin tummia. Nanokiteinen selluloosa muodostaa DODA:n kanssa tasaisen ja paksun kalvon. Selluloosananokuitu muodostaa yhdessä DODA:n kanssa melko ohuen kalvon, jonka pinnassa näkyi isotermin puristuksen aikana paljon kalvon rakenteellisista muutoksista kertovia renkaita. Anioninen selluloosananokuitu sotkee DODA:n järjestystä, eivätkä kuvat ole tasaisia kuten muilla nanoselluloosilla. On myös mahdollista, että anionisen nanokuidun BAM-kuvissa kirkkaina näkyvät paksummat rakenteet johtuvat huolellisesta sekoittamisesta huolimatta nanoselluloosasuspensioon jääneistä epätasaisuuksista. Toisaalta anioninen selluloosananokuitu saattaa puristettaessa muodostaa enemmän aggregaatteja, jotka näkyvät kuvissa kirkkaina alueina.



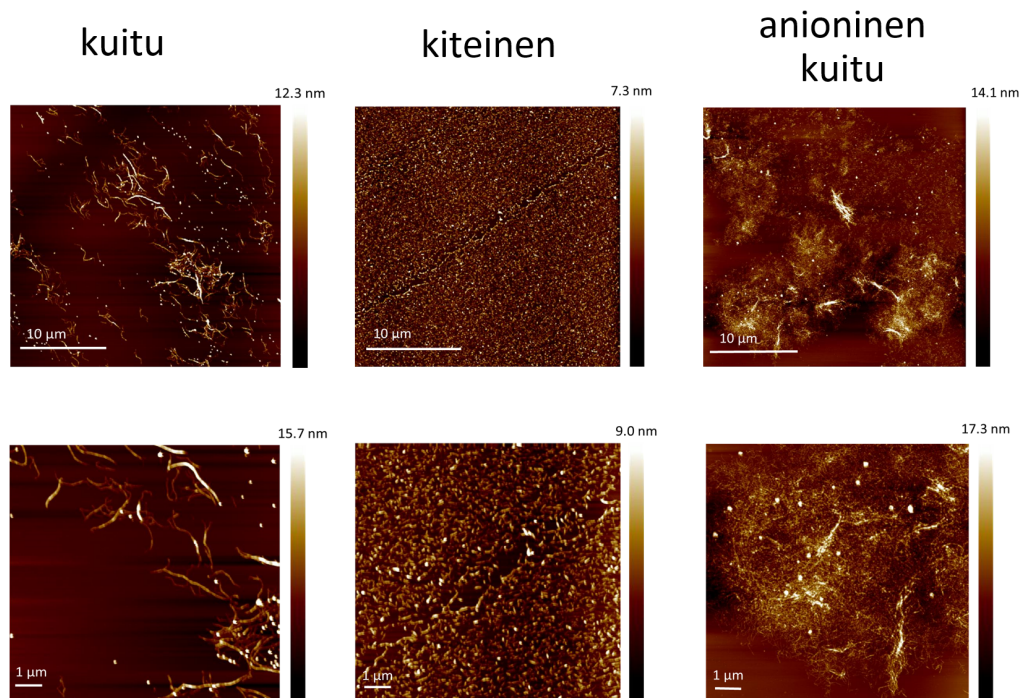
Kuva 6.8 Pelkän DODA:n, nanokiteisen selluloosan ja DODA:n, selluloosananokuidun ja DODA:n sekä anionisen selluloosananokuidun ja DODA:n muodostamat kalvot kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla pintapaineissa 10 mN/m, 25 mN/m ja 40 mN/m. Kuvia on vaalennettu siten, että niiden valkoisuusaste on 200, ja rajattu niin, että kuvan koko on $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$.



Kuva 6.9 Nanokiteisen selluloosan ja DODA:n, selluloosananokuidun ja DODA:n, anionisen selluloosananokuidun ja DODA:n sekä pelkän DODA:n muodostamat kalvot kuvattuna pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Kaikki kalvot on kasvatettu pintapaineessa 25 mN/m. Kaikki nanoselluloosakalvot on päällystetty platinalla, mutta DODA:n kalvo on kuvattu sellaisenaan. Kiihdytysjännitteenä on käytetty 1 kV nanoselluloosakalvoille ja 2 kV DODA:lle.

Eri selluloosamateriaaleista nanokiteinen selluloosa muodostaa DODA:n kanssa selvästi paksuimman ja tasaisimman kalvon. Tämä oli aivan odotettu tulos, koska kiteet järjestäytyvät helpommin ja täyttävät aukkoja kalvossa, mutta kuitujen puristaminen on vaikeampaa. Kuidut voivat puristettaessa muodostaa nanoskaalan verkostoja ja aggregoitua. Selluloosananokuitu muodostaa ohuen kalvon, joka on kuitenkin varsin tasainen. Tämä voi johtua siitä, että se ei aggregoidu yhtä voimakkaasti kuin anioninen selluloosananokuitu, mutta kuitujen verkostoon jää tasaisesti aukkoja ja siten sen peittoaste ei ole yhtä hyvä kuin nanokiteillä. BAM-kuvien perusteella anionisen selluloosananokuidun muodostama kalvo on paljon epätasaisempi kuin kahdella muulla nanoselluloosalla. Se ei myöskään näytä kirkastuvan pintapaineen kasvaessa 25 mN/m:stä 40 mN/m:in paitsi paikoin.

Kuvassa 6.9 esitetyistä SEM-kuvista nähdään, että nanokiteinen selluloosa muodostaa tasaisen, jyvämäisen rakenteen. Selluloosananokuidun kuvien perusteella nanokuidut ovat aggretoituneet yhteen ja muodostavat suurempia kuitumaisia rakenteita. SEM-kuvien mukaan anioninen selluloosananokuitu muodostaa nanokiteisen selluloosan kanssa samantyyppisen kalvon, jossa ei kuitenkaan näy jyvämäistä rakennetta. Lisää SEM-kuvia nanoselluloosasta on esitetty liitteessä A.



Kuva 6.10 Selluloosananokuidun ja DODA:n, nanokiteisen selluloosan ja DODA:n sekä anionisen selluloosananokuidun ja DODA:n muodostamat kalvot kuvattuna atomivoimamikroskoopilla. Kaikki kalvot on kasvatettu pintapaineessa 25 mN/m.

Nanoselluloosanäytteitä AFM:llä kuvatessa havaittiin, että kiteinen nanoselluloosa oli kuin tasaista mattoa substraatin pinnalla, kun taas molemmat selluloosananokuidut olivat ryhmittyneet epätasaisemmin ja muodostaneet klimppimäisiä rakenteita. Kuvassa 6.10 esitetyissä AFM-kuvissa näkyy, miten kiteisellä nanoselluloosalla on säännöllinen, tasainen rakenne, jossa yksittäiset nanokiteet erottuvat selvästi. Anioninen selluloosananokuitu sen sijaan ei näytä järjestäytyneen mihinkään suuntaan. Kiteisen nanoselluloosan kuvat olivat samantyyppisiä kuin kirjallisuudessa aiemmin on esitetty [1].

Kuten aiempien tutkimustulosten perusteella oli odotettavissakin, nanokiteinen selluloosa muodostaa tasaisia kalvoja ja sen käsittely on helppoa. Nanokuituiset selluloosat olivat kalvonmuodostuksessaan hieman haastavampia, mutta molemmat muodostivat DODA:n kanssa kalvoja. Nanokuituisten selluloosien käsittelyä ja kalvonmuodostusta on kuitenkin vielä varaa kehittää.

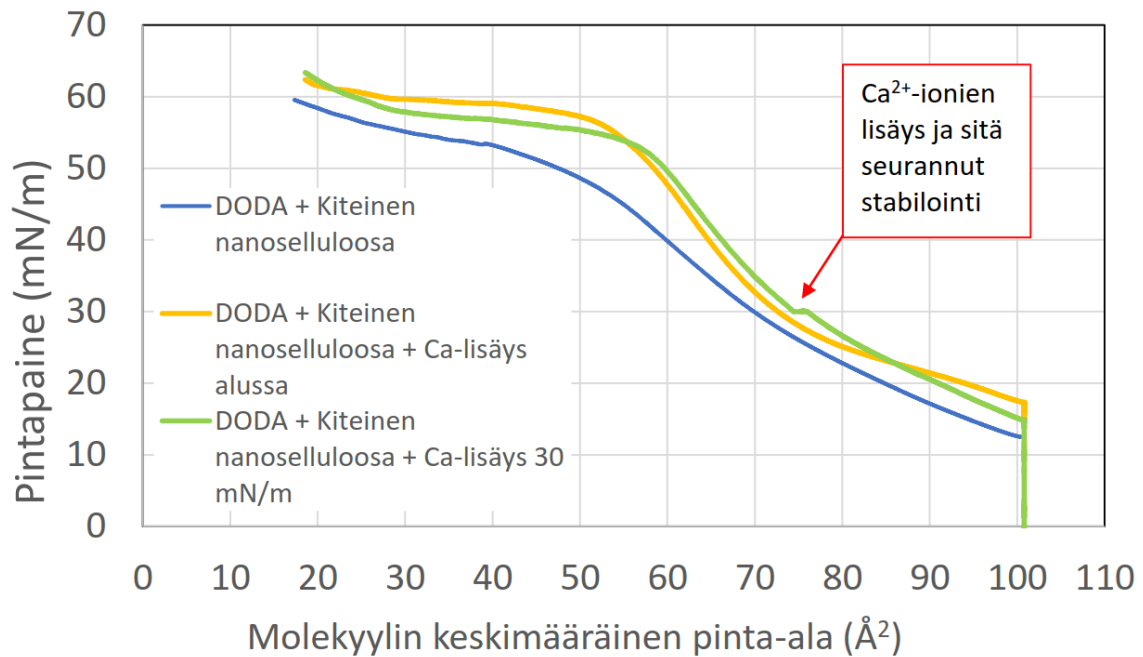
6.2 Kalsium

Kalsium-ionien vaikutusta muodostuvaan DODA:n ja nanokiteisen selluloosan muodostamaan kalvoon tutkittiin kahdella mittauksella, joista ensimmäisessä Ca^{2+} -ionit lisättiin heti stabiloinnin jälkeen ja toisessa vasta pintapaineessa 30 mN/m. Vertailuisoterminä käytettiin kiteisen nanoselluloosan ja DODA:n muodostaman kalvon isotermiä. Kaikissa mittauksissa alafaasina oli milli-Q-vesi. Koska alafaasin tilavuus oli 200 ml ja haluttu Ca^{2+} -konsentraatio 4,5 mM, Ca^{2+} -liuosta, jonka konsentraatio oli 0,9 M, pipetoitiin 1 ml alafaasin pinnan alle hyödyntäen Langmuir-altaaseen erikseen tätä tarkoitusta varten kiinnitettyä läpivientä.

Ensimmäisessä Ca^{2+} -isotermisä alafaasin pinnalle pipetoitiin ensin 1 ml kiteistä nanoselluloosaa, jonka annettiin stabiloitua 5 minuuttia. Sen päälle pipetoitiin DODA ja kalvon annettiin stabiloitua 15 minuuttia. Sitten Ca^{2+} -ionit pipetoitiin alafaasin pinnan alle ja systeemin annettiin stabiloitua vielä 15 minuuttia. Viimeisen stabiloinnin aikana pintapaine nousi vähän yli 1 mN/m.

Toinen Ca^{2+} -isotermi pipetoitiin täysin samalla tavalla kuin verrokkina käytetty DODA:n ja nanokiteisen selluloosan isotermi, mutta puomit pysäytettiin, kun isotermi oli saavuttanut pintapaineen 30 mN/m. Kalvoa pidettiin pintapaineessa 30 mN/m hetki, jotta varmistuttiin siitä, että se oli stabiloitunut. Sitten alafaasiin lisättiin Ca^{2+} -ioneja ja systeemin annettiin stabiloitua 15 minuuttia pintapaineessa 30 mN/m. Stabiloinnin aikana puomien sallittiin liikkua vain eteenpäin, jotta pintapaine ei laskenut alle 30 mN/m. Pintapaine pysyi tasaisena. Stabiloinnin jälkeen isotermi puristettiin loppuun.

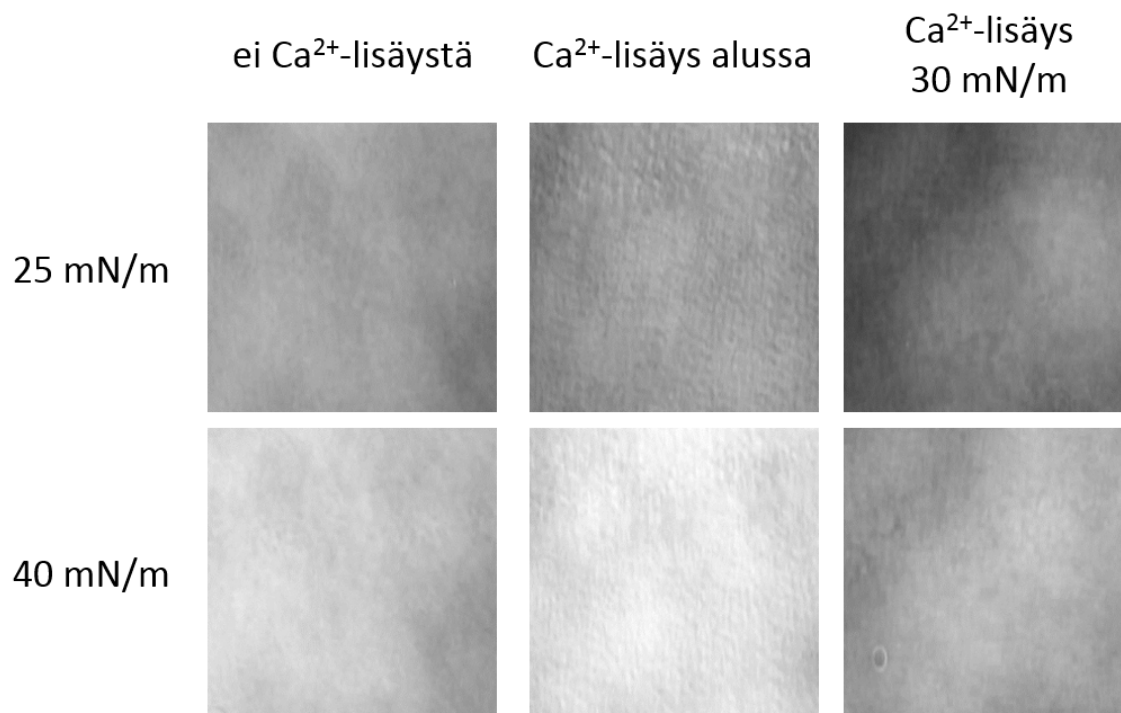
Ca^{2+} -ionien lisäys alafaasiin aiheuttaa polymeeriketjujen silloittumista, minkä pitäisi tehdä kalvosta jäykempi. Kuvan 6.11 kuvaajassa silloittumisen vaikutus isotermin näkyy erityisen hyvin 30 mN/m:n pintapaineessa tehdyssä Ca^{2+} -lisäyksessä. Ennen pintapainetta 30 mN/m ja Ca^{2+} -lisäystä kuvaaja on täysin samansuuntainen kiteisen nanoselluloosan ja DODA:n muodostaman kalvon isotermin kanssa, mutta stabiloitumisen ja Ca^{2+} -lisäyksen jälkeen se alkaa nousta jyrkemmin samansuuntaisesti Ca^{2+} -lisäys alussa -isotermin kanssa.



Kuva 6.11 Kiteisen nanoselluloosan ja DODA:n, kiteisen nanoselluloosan ja DODA:n, johon lisättiin Ca^{2+} -ioneja stabiloitumisen jälkeen, ja kiteisen nanoselluloosan ja DODA:n, johon lisättiin Ca^{2+} -ioneja pintapaineessa 30 mN/m, isotermit, pintapaine (mN/m) DODA-molekyylin keskimääräisen pinta-alan (Å²) funktiona. Alafaasina kaikissa mittauksissa oli milli-Q-vesi, jonka lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C.

Ca^{2+} -ionien aiheuttama silloittuminen näkyy myös kuvassa 6.12 esitetyissä BAM-kuvissa. Reunimmaisissa kuvapareissa (ei Ca^{2+} -lisäystä ja Ca^{2+} -lisäys pintapaineessa 30 mN/m) ei näy juuri eroa. Pintapaineessa 25 mN/m niiden kuvaama tilanne on identtinen, sillä Ca^{2+} -lisäystä ei ole vielä tehty, joten molemmissa kalvoissa on vain nanokiteistä selluloosaa ja DODA:a. Pintapaineessa 40 mN/m voi oikeanpuolimmaisessa kuvassa havaita hienorakennetta, jota ei näy vasemmanpuolimmaisessa kuvassa. Keskimäinen kuvapari (Ca^{2+} -lisäys alussa) eroaa reunimmaisista kuitenkin selvästi, joten on syytä olettaa, että keskimäisissä kuvissa molemmissa pintapaineissa näkyvä voimakas suuntautunut nystyräisyys johtuu stabiloinnin jälkeen tehdystä Ca^{2+} -lisäyksestä. Verrokkina käytetyn nanokiteisen selluloosan AFM-kuvista (kuva 6.10) nähdään, että siinä kiteet eivät ole järjestäytyneet mihinkään

suuntaan. Ca^{2+} -ionien lisäyksen aiheuttama nanoselluloosakiteiden silloittuminen muuttaa niiden järjestäytymistä. Saattaa olla, että silloittumisen johdosta kiteet ovat järjestäytyneet tiiviimmin samansuuntaisesti. Tämä pitäisi kuitenkin varmistaa kuvaamalla AFM:llä nanoselluloosakalvo, jonka alafaasiin on lisätty Ca^{2+} -ioneja.



Kuva 6.12 Nanokiteisen selluloosan ja DODA:n (ei Ca^{2+} -lisäystä), nanokiteisen selluloosan, DODA:n ja stabiloinnin jälkeen lisätyn kalsiumin (Ca^{2+} -lisäys alussa) ja nanokiteisen selluloosan, DODA:n ja pintapaineessa 30 mN/m lisätyn kalsiumin (Ca^{2+} -lisäys 30 mN/m) muodostamat kalvot kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla pintapaineissa 25 mN/m ja 40 mN/m. Kuvia on vaalennettu siten, että niiden valkoisuusaste on 200, ja rajattu niin, että kuvan koko on 200 μm x 200 μm .

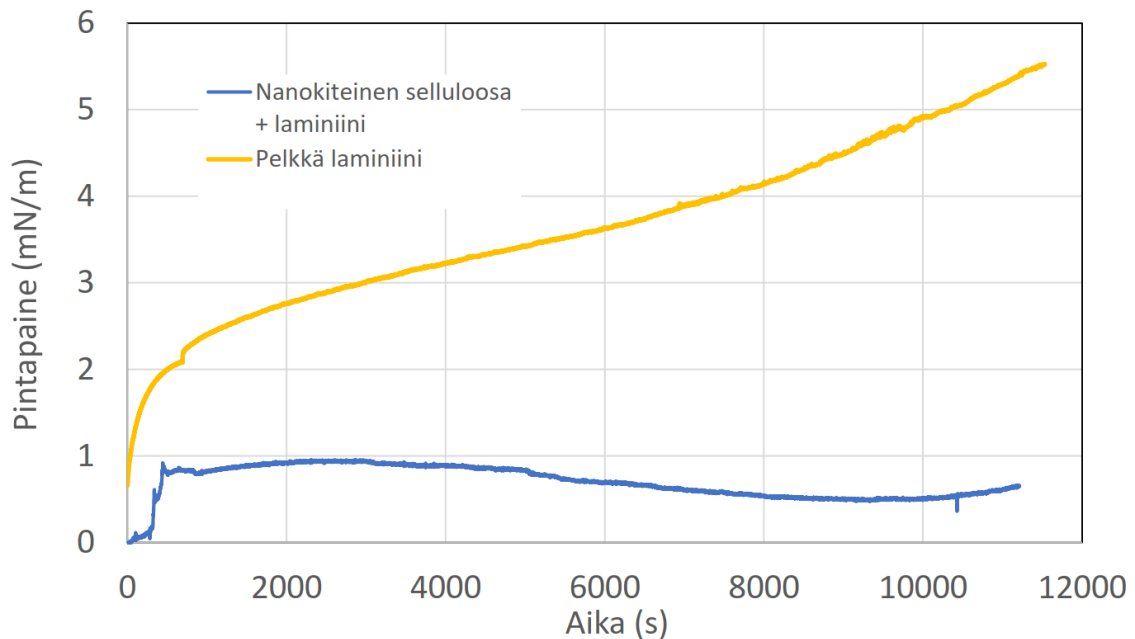
6.3 Proteiinit

Kiteistä nanoselluloosaa pipetoitiin 1 ml nopeasti yhteen paikkaan, minkä jälkeen sen annettiin stabiloitua 5 minuuttia ennen proteiiniliuoksen lisäämistä. Alafaasina kaikissa proteiinimittauksissa käytettiin 2xPBS-liuosta. Proteiinien kanssa kalvoissa ei käytetty DODA:a, koska DODA on biologisissa sovelluksissa haitallinen ja proteiinien toivottiin muodostavan nanoselluloosan kanssa kalvo myös ilman sitä.

Laminiiniliuoksen pitoisuus oli 0,1 mg/ml ja sitä pipetoitiin alafaasin pinnalle 1,8 ml. Kollageeniliuokset olivat väkevämpiä (1,0 mg/ml), ja niitä pipetoitiin vastaavasti vähemmän (180 μl). Yhteen isotermin käytettiin siis aina 180 μg proteiinia.

Proteiinien ja nanokiteisen selluloosan muodostamien kalvojen vertailunäytteeksi mitattiin DODA:n ja nanokiteisen selluloosan muodostama kalvo käyttäen alafaasina 2xPBS-liuosta. Siitä saadut BAM-kuvat olivat kuitenkin hyvin tummia, kuten kuvasta 6.3 nähdään, joten proteiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostamien kalvojen BAM-kuvien vertaaminen niihin ei ole mielekästä. Niinpä nanokiteisen selluloosan ja eri proteiinien muodostamien kalvojen kuvia on verrattu puhtaiden proteiinien muodostamien kalvojen kuviin ja niiden isotermi- ja stabilointikuvaajia on verrattu puhtaiden proteiinien vastaaviin kuvaajiin.

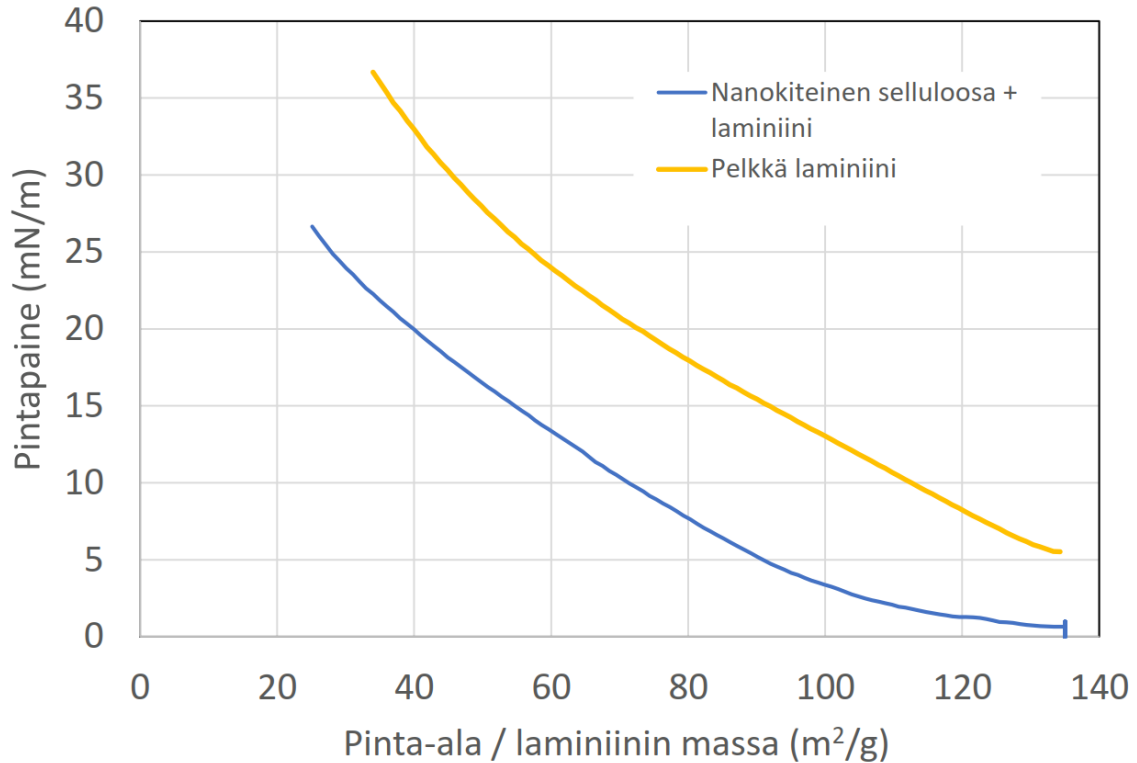
Kun kalvo tehtiin pelkästä laminiinista, pintapaine nousi nopeasti yli 2 mN/m:iin ja jatkoi nousemista koko kolmen tunnin stabiloinnin ajan, kun laminiini nousi alafaasista sen pinnalle. Jos alafaasin pinnalla oli entuudestaan nanokiteistä selluloosaa, pintapaine nousi nopeasti vajaan 1 mN/m, minkä jälkeen se heilui vähän aikaa ennen kuin alkoi laskea. Nanokiteisen selluloosan ja laminiinin yhdistelmällä pitäisi siis olla lyhyempi stabiloitumisaika, sillä pitkä stabilointi ei auttanut kalvon muodostuksessa, vaan ennemminkin jo muodostunut kalvo alkoi hajota ja painua alafaasiin. Kiteisen nanoselluloosan ja laminiinin sekä pelkän laminiinin stabiloitumiskuvaajat on esitetty kuvassa 6.13.



Kuva 6.13 Kiteisen nanoselluloosan ja laminiinin sekä pelkän laminiinin stabiloituminen, pintapaine (mN/m) ajan (s) funktiona. Alafaasina molemmissa mittauksissa oli 2xPBS, jonka lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C.

Koska pelkän laminiinin muodostama kalvo aloitti korkeammasta pintapaineesta ja nousi yhtä jyrkästi tai jyrkemmin kuin nanokiteisen selluloosan ja laminiinin

yhdessä muodostaman kalvon pintapaine, pelkän laminiinin pintapaine nousi paljon korkeammalle kuin nanokiteisen selluloosan ja laminiinin muodostaman kalvon pintapaine. Tämän voi nähdä kuvassa 6.14 esitetyistä kiteisen nanoselluloosan ja laminiinin sekä pelkän laminiinin isotermeistä.

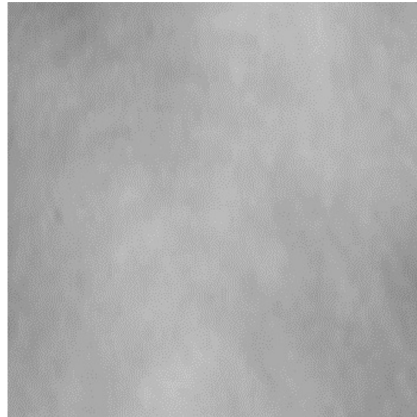


Kuva 6.14 Kiteisen nanoselluloosan ja laminiinin sekä pelkän laminiinin isotermit, pintapaine (mN/m) kalvon pinta-alan ja proteiinin massan osamäärän funktiona. Alafaasina molemmissa mittauksissa oli 2xPBS, jonka lämpötila oli $21,2 \pm 0,6$ °C.

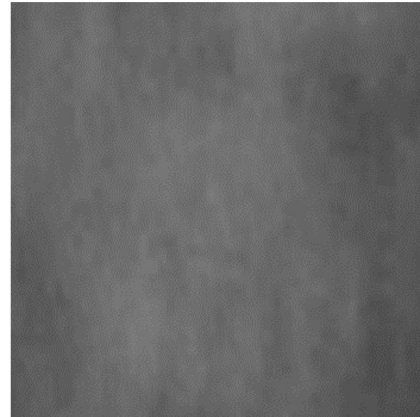
Kuvassa 6.15 on esitetty nanokiteisen selluloosan ja laminiinin yhdessä muodostama kalvo pintapaineessa 26 mN/m sekä pelkän laminiinin muodostama kalvo pintapaineessa 25 mN/m kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla. Laminiinikuvia ei ole esitetty enempää, sillä ne ovat kaikki varsin tasaisia ja hyvin samantyyppisiä. Laminiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostaman kalvon kuvat olivat kirkkaampia kuin pelkän laminiinin muodostaman kalvon kuvat, joten laminiini muodostaa paksumman kalvon nanokiteisen kalvon kanssa kuin yksinään. Laminiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostaman kalvon kuvat muistuttivat paljon nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostaman kalvon kuvia.

Laminiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostaman kalvon stabiloinnin jälkeinen pintapaine jäi alle viidesosaan pelkän laminiinin muodostaman kalvon pintapaineesta. Isotermin puristuksen aikana molempien kalvojen pintapaine nousi tasaisesti. Laminiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostaman kalvon pintapaine nousi aluksi

nanokiteinen selluloosa
+ laminiini, 26 mN/m



pelkkä laminiini,
25 mN/m

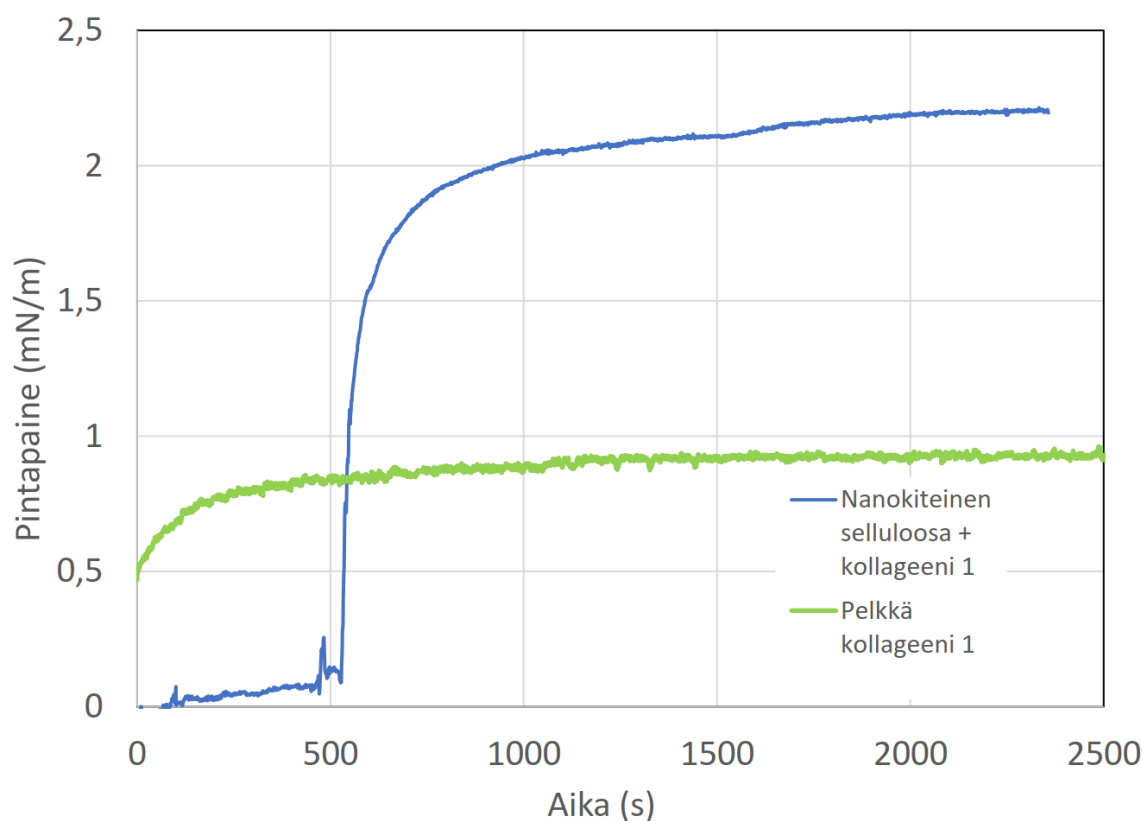


Kuva 6.15 Kuvassa on esitetty nanokiteisen selluloosan ja laminiinin yhdessä muodostama kalvo pintapaineessa 26 mN/m sekä pelkän laminiinin muodostama kalvo pintapaineessa 25 mN/m kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla. Pelkkää laminiinia sisältävässä kuvassa näkyy aaltoja, jotka johtuvat voimakkaasta tärinästä isotermiä mitattaessa. Kyseessä ei ole laminiinille tyypillinen rakenne. Kuvia on vaalennettu siten, että niiden valkoisuusaste on 200, ja rajattu niin, että kuvan koko on $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$.

hitaammin, mutta sen jälkeen kun pinta-alan ja näytteen suhde saavutti $100\ \text{m}^2/\text{g}$, molempien kalvojen isotermit olivat suunnilleen yhtä jyrkät.

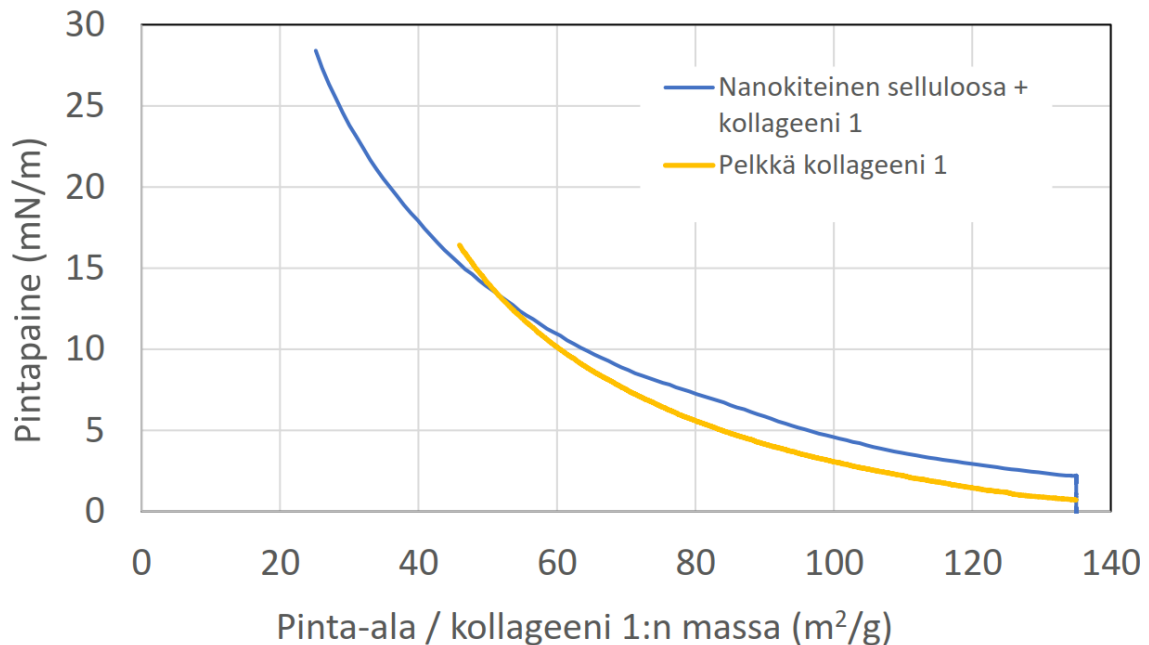
Kuvien perusteella laminiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostama kalvo on paljon paksumpi kuin pelkällä laminiinilla, mutta juuri muuta niistä ei näykään. Olisi kuitenkin kiinnostavaa selvittää esimerkiksi vasta-ainevärjäyksen avulla, onko paksummassa laminiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostamassa kalvossa laminiinia mukana vai onko kalvo pelkkää nanokiteistä selluloosaa. Laminiini ja nanokiteinen selluloosa olisi erittäin houkuttelevaa saada muodostamaan yhteinen kalvo, sillä ihmiskehoon soveltuvaa laminiinia on jo kaupallisesti saatavilla ja nanokiteisestä selluloosastakin voisi saada riittävän puhdasta.

Kollageeni 1 pipetoitiin nanokiteisen selluloosakalvon pinnalle noin 500 sekunnin kohdalla, minkä jälkeen pintapaine nousi nopeasti yli kaksi kertaa niin korkeaksi kuin pelkällä kollageeni 1:llä. Nanokiteinen selluloosa ja kollageeni 1 muodostavat yhdessä kalvon oikein hyvin. Kollageeni 1:n ja nanokiteisen selluloosan ja pelkän kollageeni 1:n stabilointikuvaajat on esitetty kuvassa 6.16.



Kuva 6.16 Kuvaajassa on esitetty kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 1:n sekä pelkän kollageeni 1:n stabiloituminen pipetoinnin jälkeen, pintapaine (mN/m) ajan (s) funktiona. Alafaasina molemmissa mittauksissa oli 2xPBS, jonka lämpötila oli nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n isotermissä $21,2 \pm 0,6$ °C ja pelkän kollageeni 1:n isotermissä $20,8 \pm 0,5$ °C. Kollageeni 1 pipetoitiin nanokiteisen selluloosakalvon pinnalle noin 500 sekunnin kohdalla, minkä jälkeen pintapaine nousi nopeasti yli kaksi kertaa niin korkeaksi kuin pelkällä kollageeni 1:llä.

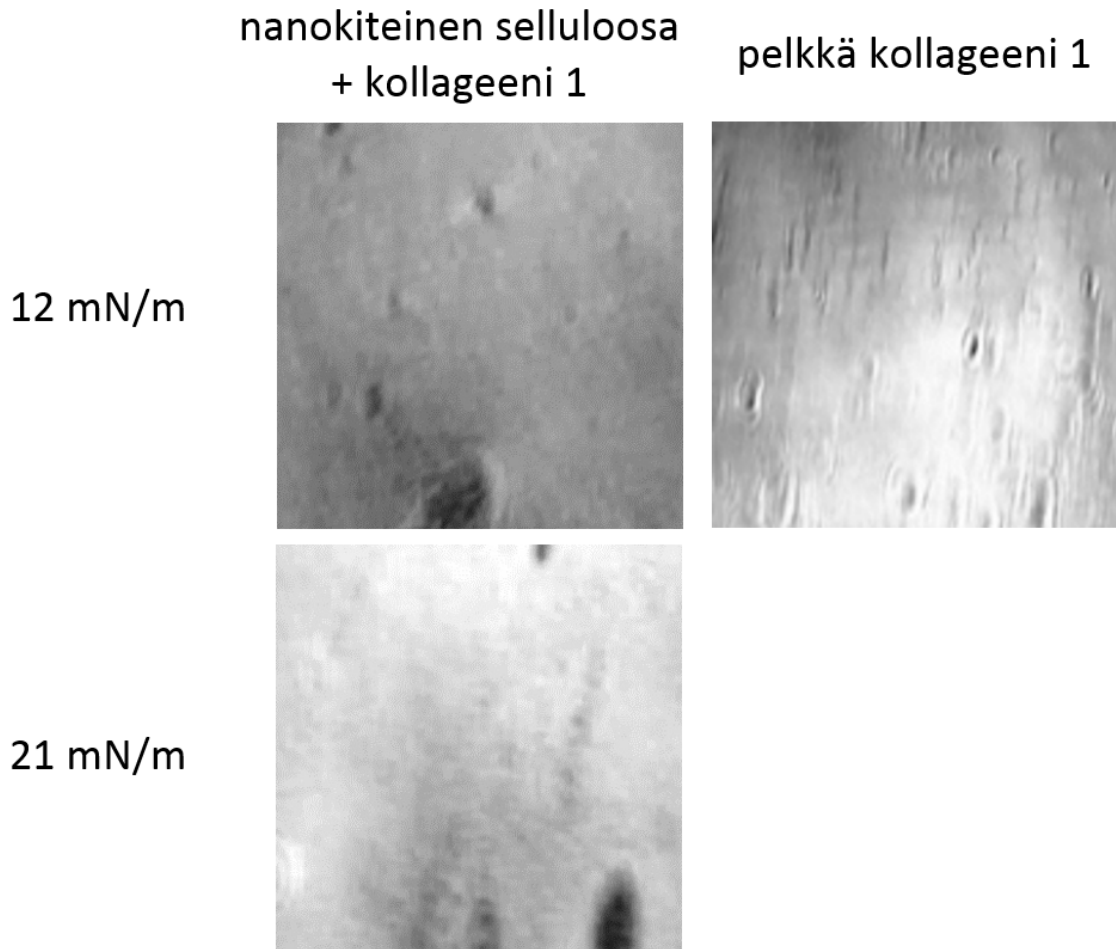
Kuvasta 6.17 nähdään, että kollageeni 1:llä on nanokiteisen selluloosan kanssa koko ajan korkeampi pintapaine kuin pelkällä kollageeni 1:llä ja nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostaman kalvon pintapaine myös nousee paljon suuremmaksi kuin pelkällä kollageeni 1:llä. Isotermistä voidaan päätellä, että kollageeni 1 ja nanokiteinen selluloosa muodostavat kalvon yhdessä.



Kuva 6.17 Kuvaajassa on esitetty kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 1:n sekä pelkän kollageeni 1:n isotermit pintapaine (mN/m) kalvon pinta-alan ja kollageeni 1:n massan osamäärän funktiona. Alafaasina molemmissa mittauksissa oli 2xPBS, jonka lämpötila oli nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n isotermissä $21,2 \pm 0,6$ °C ja pelkän kollageeni 1:n isotermissä $20,8 \pm 0,5$ °C. Kollageeni 1:llä on nanokiteisen selluloosan kanssa koko ajan korkeampi pintapaine kuin pelkällä kollageeni 1:llä ja nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostaman kalvon pintapaine myös nousee paljon suuremmaksi kuin pelkällä kollageeni 1:llä.

Kuvassa 6.18 on esitetty kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 1:n sekä pelkän kollageeni 1:n muodostamat kalvot kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla pintapaineissa 12 mN/m ja 21 mN/m. Pelkästä kollageeni 1:stä ei ole kuvaa pintapaineessa 21 mN/m, koska sen pintapaine ei nouse niin korkealle, kuten voidaan nähdä kuvasta 6.17. BAM-kuvista nähdään hienosti, miten nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostamassa kalvossa näkyy piirteitä sekä pelkän kollageeni 1:n kalvosta että nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostamasta kalvosta. Pelkän kollageeni 1:n kalvoille tyypillinen epätasainen, matalampia alueita sisältävä rakenne näkyy yhdistelmäkalvon kuvissa, mutta nanokiteinen selluloosa muokkaa matalampia alueita suuremmiksi ja pyöreämmiksi. Kollageeni 1:n yksin muodostama kalvo on melko ohut, ja on todennäköistä, että nanokiteinen selluloosa tekee kalvosta

paksumman.

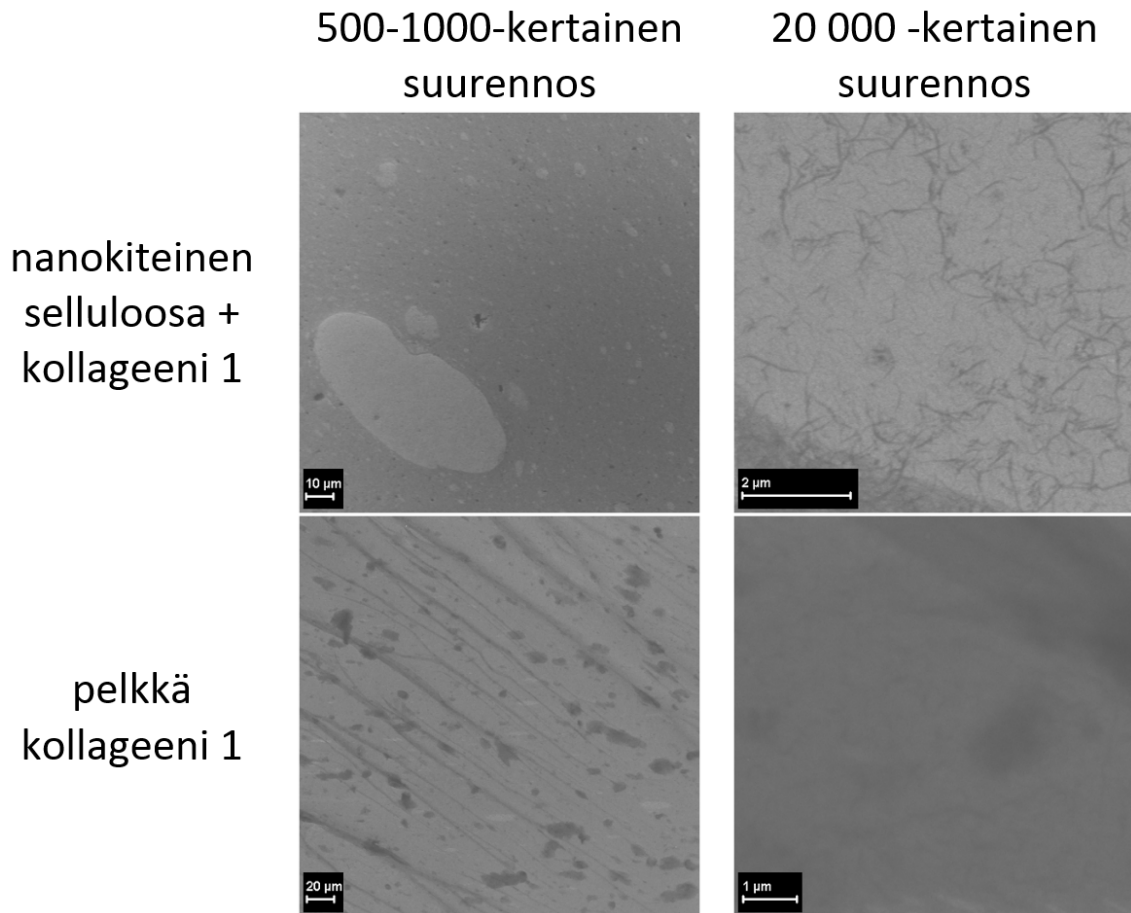


Kuva 6.18 Kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 1:n sekä pelkän kollageeni 1:n muodostamat kalvot kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla pintapaineissa 12 mN/m ja 21 mN/m. Pelkästä kollageeni 1:stä ei ole kuvaa pintapaineessa 21 mN/m, koska sen pintapaine ei nouse niin korkealle, kuten voi nähdä kuvasta 6.17. Kuvia on vaalennettu siten, että niiden valkoisuusaste on 200, ja rajattu niin, että kuvan koko on $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$. Pelkän kollageeni 1:n kuva on julkaisijan luvalla toistettu artikkelista [111].

Kuvassa 6.19 on nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n sekä pelkän kollageeni 1:n muodostamat kalvot kuvattuna pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Vasemmanpuolimmaisista kuvista nähdään, että pelkän kollageeni 1:n muodostama kalvo on hyvin epätasainen ja nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostamassa kalvossa on vaaleita, soikeita alueita, mutta muuten se on varsin tasainen.

Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n kuvat ovat samasta kohdasta. Oikeanpuolimmaisessa kuvassa on kuvattu lähempää vaaleaa, soikeaa aluetta, joka näkyy vasemmanpuolimmaisesta kuvasta vasemmassa alakulmassa. Tummuusero voisi johtua esimerkiksi erosta kollageeni 1:n konsentraatiossa. Vaalea alue voisi sisältää lähinnä nanokiteistä selluloosaa ja tumma alue kollageenin ja selluloosan seosta. On myös

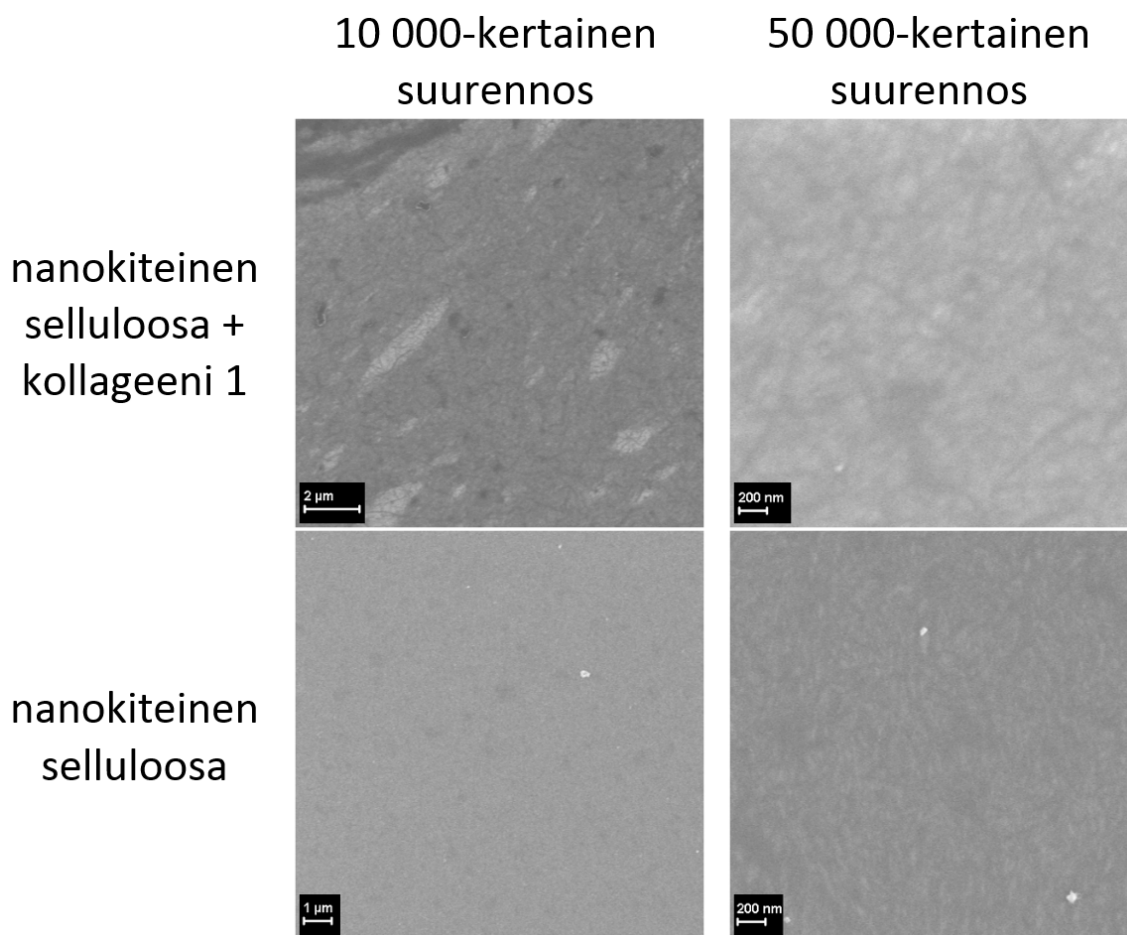
mahdollista, että vaalea alue kuvaa kalvossa olevaa aukkoa.



Kuva 6.19 Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n sekä pelkän kollageeni 1:n muodostamat kalvot kuvattuna pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostama kalvo on kasvatettu pintapaineessa 15 mN/m ja pelkän kollageeni 1:n muodostama kalvo pintapaineessa 12 mN/m. Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostamasta kalvosta on 1000- ja 20 000-kertaiset suurennokset ja pelkän kollageeni 1:n muodostamasta kalvosta 500- ja 20 000-kertaiset suurennokset. Kiihdytysjännitteenä on käytetty nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostamalle kalvolle 0,5 kV ja pelkän kollageeni 1:n muodostamalle kalvolle 3 kV.

Kuvassa 6.20 on verrattu nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n sekä nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostamien kalvojen SEM-kuvia pintapaineessa 20 mN/m. 50 000-kertaisista suurennoksista nähdään, että nanokiteinen selluloosa ja kollageeni 1 muodostavat yhdessä kuitumaisia rakenteita. Nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostamassa kalvossa niitä ei näy, vaan rakenne on jyvämäinen. Lisää kuvia nanokiteisestä selluloosasta ja kollageeni 1:stä on esitetty liitteessä A.

Sekä BAM- että SEM-kuvissa nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostama kalvo eroaa selvästi sekä pelkän kollageeni 1:n että nanokiteisen selluloosan ja DODA:n

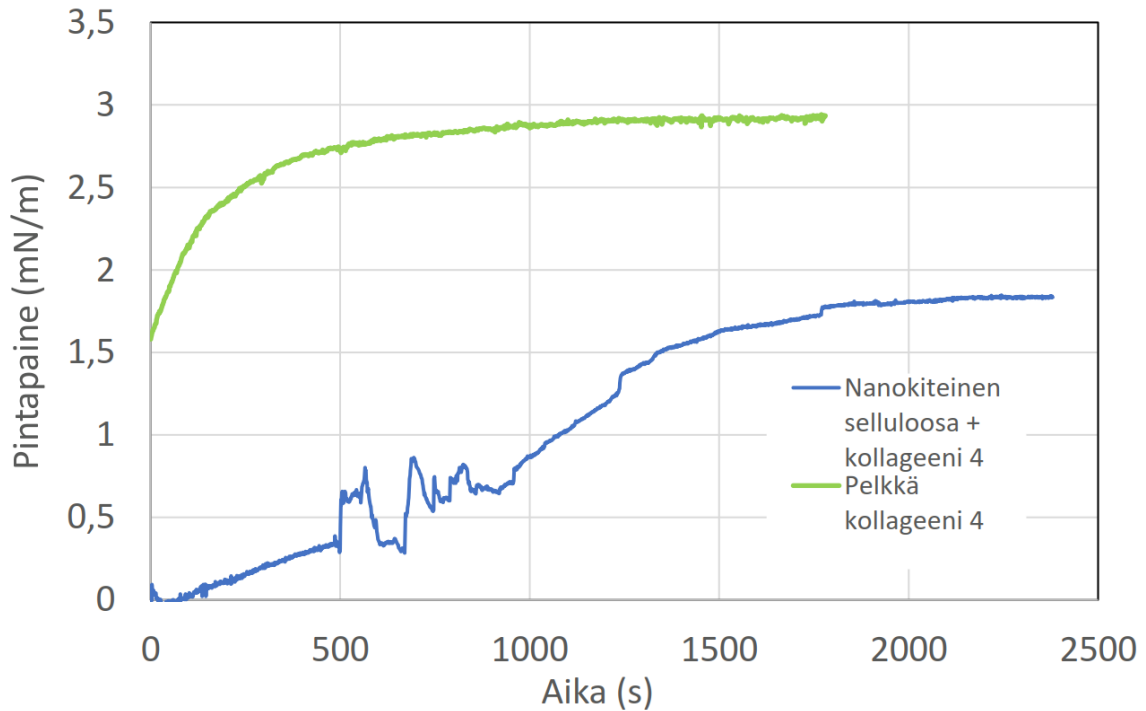


Kuva 6.20 Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n sekä nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostamat kalvot kuvattuna pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Molemmat kalvot on kasvatettu pintapaineessa 20 mN/m. Kiihdytysjännitteenä on käytetty nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostamalle kalvolle 0,5 kV ja nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostamalle kalvolle 2 kV.

muodostamista kalvosta. Niinpä näiden tulosten perusteella voidaankin pitää varmana, että kollageeni 1:n ja nanokiteinen selluloosa muodostavat kalvon yhdessä.

Kollageeni 4:n lisäämisen jälkeen pintapaine ei noussut samoin kuin pelkällä kollageeni 4:llä, jolla pintapaine nousi pipetoinnin aikana yli 1,5 mN/m:n. Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 4:n muodostaman kalvon pintapaine nousi pipetoinnin aikana noin 0,4 mN/m ja puolen tunnin stabiloinnin aikana se nousi vielä noin 1 mN/m. Kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 4:n sekä pelkän kollageeni 4:n stabiloitumiskurveja on piirretty kuvaan 6.21.

Kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 4:n stabiloinnissa nanokiteisen selluloosan pintapaine nousi poikkeuksellisen paljon ennen kollageeni 4:n lisäämistä noin 500 sekunnin kohdalla. Yleensä pintapaine nousi korkeintaan 0,1 mN/m pelkän nanokiteisen

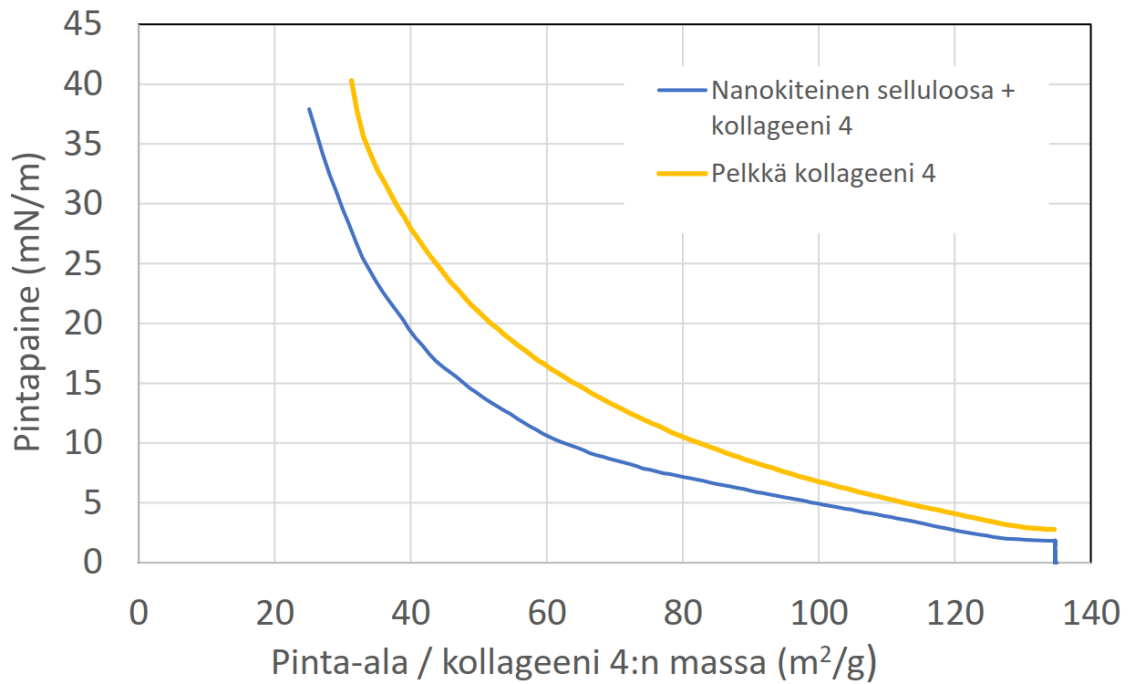


Kuva 6.21 Kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 4:n sekä pelkän kollageeni 4:n stabiloituminen pipetoinnin jälkeen, pintapaine (mN/m) ajan (s) funktiona. Alafaasina molemmissa mittauksissa oli 2xPBS, jonka lämpötila oli nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 4:n isotermissä $21,2 \pm 0,6$ °C ja pelkän kollageeni 4:n isotermissä $20,8 \pm 0,5$ °C.

selluloosan pipetoinnin aikana riippumatta siitä, oliko alafaasina milli-Q-vesi vai 2xPBS. Kollageeni 4:n lisäämisen jälkeen pintapaine ei noussut samoin kuin pelkällä kollageeni 4:llä, jolla pintapaine nousi pipetoinnin aikana yli 1,5 mN/m:n, vaan kollageeni 4 meni nanokiteisen selluloosan muodostaman kalvon läpi alafaasiin. Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 4:n muodostaman kalvon pintapaine nousi pipetoinnin aikana noin 0,4 mN/m, ja puolen tunnin stabiloinnin aikana se nousi vielä noin 1 mN/m.

Kollageeni 4:n stabiloitumiselle on tyypillistä, että se muodostaa rakenteita alafaasin pinnalle ja kerää samalla lisää kollageeni 4:ää alafaasista. Nanokiteinen selluloosa sen sijaan jää pintaan, eikä sitä kerry samalla lailla lisää stabiloinnin aikana. Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 4:n muodostaman kalvon pintapaine oli koko mittauksen ajan pienempi kuin pelkän kollageeni 4:n muodostaman kalvon. Tämän voi nähdä isotermeistä, jotka on esitetty kuvassa 6.22.

Kuvasta 6.23 näkyy, miten pelkän kollageeni 4:n muodostamassa kalvossa on tyypillisesti laajoja matalampia alueita, mutta nanokiteisen selluloosan kanssa kalvo on tasaisempi. Toisaalta kuvista näkyy myös, että kollageeni 4:n yksin muodostama kalvo on paljon paksumpi, eli kuva on kirkkaampi kuin nanokiteisen selluloosan ja



Kuva 6.22 Kiteisen nanoselluloosan ja kollageeni 4:n sekä pelkän kollageeni 4:n isotermit pintapaine (mN/m) kalvon pinta-alan ja kollageeni 4:n massan osamäärän funktiona. Alafaasina molemmissa mittauksissa oli 2xPBS-liuos, jonka lämpötila oli nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 4:n isotermissä $21,2 \pm 0,6$ °C ja pelkän kollageeni 4:n isotermissä $20,8 \pm 0,5$ °C.

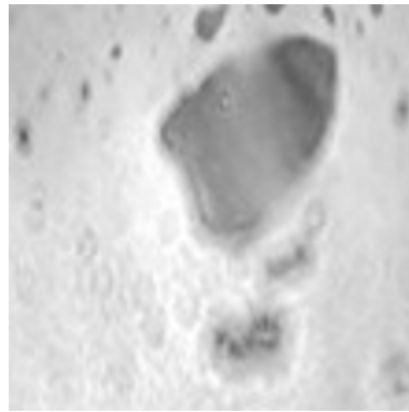
kollageeni 4:n yhdessä muodostama kalvo. Tämä ei ole yllättävää, sillä kuvassa 6.21 olevasta stabilointikuvaajasta nähdään, miten kollageeni 4 ja nanokiteinen selluloosa eivät stabiloidu yhdessä yhtä hyvin kuin pelkkä kollageeni 4, ja kuvassa 6.22 olevan isotermikuvaajan perusteella pintapaine on koko ajan pienempi.

Kollageenit 1 ja 4 käyttäytyvät nanokiteisen selluloosan kanssa hyvin eri tavoin, mikä todennäköisesti selittyy niiden erilaisella taipumuksella järjestäytyä suuremmiksi rakenteiksi: kollageeni 1 muodostaa kuitumaisia ja kollageeni 4 verkkomaisia rakenteita. Ennen pipetointia kollageeniliuokset käsiteltiin siten, että kollageenimolekyylit olivat niissä erillään eivätkä supramolekulaarisissa komplekseissa. Kun kollageeniliuos, jonka pH oli 3, pipetoitiin puskuroidun (pH 7,4) alafaasin pinnalle, pH-muutos sai aikaan järjestäytymisen isommiksi rakenteiksi. Ilmeisesti kollageeni 1 pystyy siis järjestäytymään myös nanokiteisen selluloosan läsnäollessa, mutta kollageeni 4:n järjestäytymistä nanokiteinen selluloosa häiritsee. Kollageeni 4:n ja nanokiteisen selluloosan isotermit kannattaisi kuitenkin ehdottomasti toistaa, sillä stabiloituminen poikkesi aikaisemmista sekä nanokiteisen selluloosan että kollageeni 4:n pipetoinnin osalta.

nanokiteinen selluloosa
+ kollageeni 4, 14 mN/m



pelkkä kollageeni 4,
10 mN/m



Kuva 6.23 Kuvissa on nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 4:n muodostama kalvo pintapaineessa 14 mN/m sekä pelkän kollageeni 4:n muodostama kalvo pintapaineessa 10 mN/m kuvattuna Brewsterin kulma -mikroskoopilla. Kuvia on vaalennettu siten, että niiden valkoisuusaste on 200, ja rajattu niin, että kuvan koko on $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$. Pelkän kollageeni 4:n kuva on julkaisijan luvalla toistettu artikkelista [111].

7. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä valmistettiin Langmuir-Schaeffer-menetelmällä kalvoja kolmesta eri nanoselluloosamateriaalista: nanokiteisestä selluloosasta, selluloosananokuidusta ja anionisesta selluloosananokuidusta. Apuna kalvonmuodostuksessa käytettiin kationista pinta-aktiivista ainetta DODA:a. Kalvot kuvattiin BAM:lla, SEM:llä ja AFM:llä. Kuvien perusteella nähtiin, että nanokiteinen selluloosa muodosti tasaisia kalvoja kun taas kuitumaisen ja anionisen kuitumaisen nanoselluloosa muodostamat kalvot olivat epäsäännöllisempiä. Nanokiteisen selluloosan käsittely oli helppoa, mutta nanokuituiset selluloosat olivat kalvonmuodostuksessaan hieman haastavampia. Niiden käsittelyä ja kalvonmuodostusta onkin vielä varaa kehittää.

Nanokiteisen selluloosan alafaasiin kokeiltiin lisätä Ca^{2+} -ioneja, minkä uskottiin aiheuttavan selluloosamolekyylien silloittumista. Saatua kalvo oli jäykempi kuin vertailukohtana käytetty nanokiteisen selluloosan kalvo ilman Ca^{2+} -ioneja, ja BAM-kuvissa havaittiin kalvoilla olevan erilainen rakenne. Silloittuminen muuttaa nanoselluloosakiteiden järjestäytymistä. Epäiltiin, että silloittumisen johdosta kiteet järjestäytyivät tiiviimmin samansuuntaisesti. Tämä pitäisi kuitenkin varmistaa kuvamalla AFM:llä nanoselluloosakalvo, jonka alafaasiin on lisätty Ca^{2+} -ioneja.

Myös nanokiteisen selluloosan ja kolmen eri proteiinin (laminiini, kollageeni 1 ja kollageeni 4) yhdistelmiä kokeiltiin. Laminiini muodosti nanokiteisen kalvon kanssa paksumman kalvon kuin yksinään. Olisi kuitenkin mielenkiintoista selvittää, onko paksummassa laminiinin ja nanokiteisen selluloosan muodostamassa kalvossa laminiinia mukana vai onko kalvo pelkkää nanokiteistä selluloosaa. Laminiini ja nanokiteinen selluloosa olisi erittäin houkuttelevaa saada muodostamaan yhteinen kalvo, sillä ihmiskehoon soveltuvaa laminiinia on jo kaupallisesti saatavilla ja nanokiteisestä selluloosastakin voisi saada riittävän puhdasta.

Nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostamassa kalvossa näkyi selvästi piirteitä sekä pelkän kollageeni 1:n kalvosta että nanokiteisen selluloosan ja DODA:n muodostamasta kalvosta. Pelkän kollageeni 1:n kalvoille tyypillinen epätasainen, matalampia alueita sisältävä rakenne näkyi yhdistelmäkalvon kuvissa, mutta nanokiteinen selluloosa muokkasi matalampia alueita suuremmiksi ja pyöreämmiksi.

Kollageeni 1:n yksin muodostama kalvo on melko ohut, ja on todennäköistä, että nanokiteinen selluloosa teki kalvosta paksumman. Tässä työssä saatujen tulosten perusteella voidaan kuitenkin pitää varmana, että kollageeni 1:n ja nanokiteinen selluloosa muodostavat kalvon yhdessä.

Pelkän kollageeni 4:n muodostamassa kalvossa on tyypillisesti laajoja matalampia alueita, mutta nanokiteisen selluloosan kanssa kalvo oli tasaisempi. Toisaalta nähtiin myös, että kollageeni 4:n yksin muodostama kalvo oli paljon paksumpi kuin nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 4:n yhdessä muodostama kalvo.

Jatkossa olisikin kiinnostavaa optimoida proteiinien ja nanoselluloosan kalvonmuodostusta. Nyt käytetyt määrät ja olosuhteet perustuivat aiemmin tehtyihin pelkkää proteiinia sisältäviin kalvoihin, eikä erilaisia proteiinien ja nanoselluloosan määriä tai kalvonmuodostusolosuhteita kokeiltu lainkaan. Proteiinikalvoja olisi mielenkiintoista myös tutkia tarkemmin ja selvittää esimerkiksi vasta-ainevärjäyksen avulla, jakautuivatko nanoselluloosa ja proteiini kalvoihin tasaisesti vai muodostivatko ne erillisiä alueita. Proteiinien kalvonmuodostusta voisi kokeilla myös kuitumaisen nanoselluloosan kanssa. Nanokuituisen selluloosan ja DODA:n muodostaman kalvon AFM-kuvassa kuidut eivät näyttäneet suuntautuneen mitenkään. Olisikin kiinnostavaa nähdä, vaikuttaisiko kuitumainen kollageeni 1 kuitumaisen nanoselluloosan suuntautumiseen jotenkin.

LÄHTEET

- [1] Y. Habibi, I. Hoeger, S. S. Kelley, and O. J. Rojas, “Development of langmuir-schaeffer cellulose nanocrystal monolayers and their interfacial behaviors,” *Langmuir*, vol. 26, no. 2, pp. 990–1001, 2010.
- [2] G. Roberts, *Langmuir-Blodgett Films*. Plenum Press, 1990.
- [3] G. T. Barnes and I. R. Gentle, *Interfacial science: an introduction*. Oxford University Press, 2011.
- [4] D. K. Martin, ed., *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes*, ch. Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes. Springer Science+Business Media, LLC, 2007.
- [5] M. Aumailley, “The laminin family,” *Cell Adhesion & Migration*, vol. 7, no. 1, pp. 48–55, 2013.
- [6] B. L. Patton, “Laminins of the neuromuscular system,” *Microscopy research and technique*, vol. 51, pp. 247–261, 2000.
- [7] K. Gelse, E. Pöschl, and T. Aigner, “Collagens - structure, function, and biosynthesis,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, pp. 1531–1546, 2003.
- [8] A. P. H. Rodrigues, S. D. de Souza, C. S. B. Gil, F. V. Pereira, L. C. A. de Oliveira, and P. S. de Oliveira Patrício, “Biobased nanocomposites based on collagen, cellulose nanocrystals, and plasticizers,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 134, no. 25, pp. 44954–44962, 2017.
- [9] B. Franklin, W. Brownrigg, and M. Farish, “Of the stilling of waves by means of oil,” *Philosophical Transactions*, vol. 64, pp. 445–460, 1774.
- [10] L. Rayleigh, “Measurements of the amount of oil necessary in order to check the motions of camphor upon water,” *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 47, pp. 364–367, 1889.
- [11] M. C. Petty, *Langmuir-Blodgett films: an introduction*. Cambridge University Press, 1996.
- [12] “Langmuir and langmuir-blodgett films: What and how?,” Application Note 107, KSV Instruments LTD, P.O. Box 128, 00381 Helsinki, Finland.

- [13] T. Tammelin, T. Saarinen, M. Österberg, and J. Laine, "Preparation of langmuir/blodgett-cellulose surfaces by using horizontal dipping procedure. application for polyelectrolyte adsorption studies performed with qcm-d," *Cellulose*, vol. 13, pp. 519–535, 2006.
- [14] "Why brewster angle microscopy - bam," tech. rep., KSV Instruments LTD, Höyläämötie 11 B, 00380 Helsinki, Finland.
- [15] Y. Habibi, L. Foulon, V. Aguié-Béghin, M. Molinari, and R. Douillard, "Langmuir-blodgett films of cellulose nanocrystals: Preparation and characterization," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 316, pp. 388–397, 2007.
- [16] Y. Habibi, L. A. Lucia, and O. J. Rojas, "Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications," *Chemical Reviews*, vol. 110, pp. 3479–3500, 2010.
- [17] B. Medronho, A. Romano, M. G. Miguel, L. Stigsson, and B. Lindman, "Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions," *Cellulose*, vol. 19, pp. 581–587, 2012.
- [18] I. Siró and D. Plackett, "Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review," *Cellulose*, vol. 17, pp. 459–494, 2010.
- [19] C. Aulin, S. Ahola, P. Josefsson, T. Nishino, Y. Hirose, M. Österberg, and L. Wågberg, "Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures - their surface properties and interaction with water," *Langmuir*, vol. 25, no. 13, pp. 7675–7685, 2009.
- [20] J. O. Zoppe, Y. Habibi, O. J. Rojas, R. A. Venditti, L.-S. Johansson, K. Efimenko, M. Österberg, and J. Laine, "Poly(n-isopropylacrylamide) brushes grafted from cellulose nanocrystals via surface-initiated single-electron transfer living radical polymerization," *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 2683–2691, 2010.
- [21] E. Sjöström, *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Academic Press, 1993.
- [22] D. J. Gardner, G. S. Oporto, R. Mills, and M. A. S. A. Samir, "Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 22, pp. 545–567, 2008.

- [23] S.-Y. Ding and M. E. Himmel, “The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, pp. 597–606, 2006.
- [24] C. Somerville, S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk, and H. Youngs, “Toward a systems approach to understanding plant cell walls,” *Science*, vol. 306, pp. 2206–2211, 2004.
- [25] T. Taipale, M. Österberg, A. Nykänen, J. Ruokolainen, and J. Laine, “Effect of microfibrillated cellulose and fines on the drainage of kraft pulp suspension and paper strength,” *Cellulose*, vol. 17, pp. 1005–1020, 2010.
- [26] Y. Habibi, H. Chanzy, and M. R. Vignon, “Tempo-mediated surface oxidation of cellulose whiskers,” *Cellulose*, vol. 13, pp. 679–687, 2006.
- [27] M. A. S. A. Samir, F. Alloin, and A. Dufresne, “Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field,” *Biomacromolecules*, vol. 6, pp. 612–626, 2005.
- [28] K. Syverud and P. Stenius, “Strength and barrier properties of mfc films,” *Cellulose*, vol. 16, pp. 75–85, 2009.
- [29] D. M. Bruce, R. N. Hobson, J. W. Farrent, and D. G. Hepworth, “High-performance composites from low-cost plant primary cell walls,” *Composites: Part A*, vol. 36, pp. 1486–1493, 2005.
- [30] J. Juntaro, M. Pommet, G. Kalinka, A. Mantalaris, M. S. P. Shaffer, and A. Bismarck, “Creating hierarchical structures in renewable composites by attaching bacterial cellulose onto sisal fibers,” *Advanced Materials*, vol. 20, pp. 3122–3126, 2008.
- [31] A. López-Rubio, J. M. Lagaron, M. Ankerfors, T. Lindström, D. Nordqvist, A. Mattozzi, and M. S. Hedenqvist, “Enhanced film forming and film properties of amylopectin using microfibrillated cellulose,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 68, pp. 718–727, 2007.
- [32] M. E. Malainine, M. Mahrouz, and A. Dufresne, “Thermoplastic nanocomposites based on cellulose microfibrils from opuntia ficus-indica,” *Composites Science and Technology*, vol. 65, pp. 1520–1526, 2005.
- [33] A. N. Nakagaito and H. Yano, “Novel high-strength biocomposites based on microfibrillated cellulose having nano-order-unit web-like network structure,”

- Applied Physics A - Materials Science & Processing*, vol. 80, pp. 155–159, 2005.
- [34] G. Siqueira, J. Bras, and A. Dufresne, “Cellulose whiskers versus microfibrils: Influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites,” *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 425–432, 2009.
- [35] H. Ougiya, K. Watanabe, Y. Morinaga, and F. Yoshinaga, “Emulsion-stabilizing effect of bacterial cellulose,” *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol. 61, no. 9, pp. 1541–1545, 1997.
- [36] M. Andresen, P. Stenstad, T. Møretrø, S. Langsrud, K. Syverud, L.-S. Johansson, and P. Stenius, “Nonleaching antimicrobial films prepared from surface-modified microfibrillated cellulose,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 2149–2155, 2007.
- [37] W. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, and R. M. B. Jr., “The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications,” *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2007.
- [38] H. Fukuzumi, T. Saito, T. Iwata, Y. Kumamoto, and A. Isogai, “Transparent and high gas barrier films of cellulose,” *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 162–165, 2009.
- [39] M. Nogi, S. Iwamoto, A. N. Nakagaito, and H. Yano, “Optically transparent nanofiber paper,” *Advanced Materials*, vol. 21, pp. 1595–1598, 2009.
- [40] M. Nogi and H. Yano, “Transparent nanocomposites based on cellulose produced by bacteria offer potential innovation,” *Advanced Materials*, vol. 20, pp. 1849–1852, 2008.
- [41] H. Yano, J. Sugiyama, A. N. Nakagaito, M. Nogi, T. Matsuura, M. Hikita, and K. Handa, “Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers,” *Advanced Materials*, vol. 17, no. 2, pp. 153–155, 2005.
- [42] F. W. Herrick, R. L. Casebier, J. K. Hamilton, and K. R. Sandberg, “Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility,” *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium*, vol. 37, pp. 797–813, 1983.

- [43] M. Pääkkö, M. Ankerfors, H. Kosonen, A. Nykänen, S. Ahola, M. Österberg, J. Ruokolainen, J. Laine, P. T. Larsson, O. Ikkala, and T. Lindström, “Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1934–1941, 2007.
- [44] A. F. Turbak, F. W. Snyder, and K. R. Sandberg, “Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses and commercial potential,” *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium*, vol. 37, pp. 815–827, 1983.
- [45] S. Dong and M. Roman, “Fluorecently labeled cellulose nanocrystals for bioimaging applications,” *JACS Communication*, vol. 129, no. 45, pp. 13810–13811, 2007.
- [46] K. Abe, S. Iwamoto, and H. Yano, “Obtaining cellulose nanofibers with uniform width of 15 nm from wood,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 3276–3278, 2007.
- [47] W. Chen, H. Yu, Y. Liu, Y. Hai, M. Zhang, and P. Chen, “Isolation and characterization of cellulose nanofibers from four plant cellulose fibers using a chemical-ultrasonic process,” *Cellulose*, vol. 18, pp. 433–442, 2011.
- [48] S. Iwamoto, A. N. Nakagaito, H. Yano, and M. Nogi, “Optically transparent composites reinforced with plant fiber-based nanofibers,” *Applied Physics A - Materials Science & Processing*, vol. 81, pp. 1109–1112, 2005.
- [49] A. Bhatnagar and M. Sain, “Processing of cellulose nanofiber-reinforced composites,” *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, vol. 24, pp. 1259–1268, 2005.
- [50] S. Janardhnan and M. M. Sain, “Isolation of cellulose microfibrils - an enzymatic approach,” *BioResources*, vol. 1, no. 2, pp. 176–188, 2006.
- [51] T. Saito, M. Hirota, N. Tamura, S. Kimura, H. Fukuzumi, L. Heux, and A. Isogai, “Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using tempo catalyst under neutral conditions,” *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 1992–1996, 2009.
- [52] T. Saito and A. Isogai, “Introduction of aldehyde groups on surfaces of native cellulose fibers by tempo-mediated oxidation,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 289, pp. 219–225, 2006.

- [53] T. Saito and A. Isogai, "Wet strength improvement of tempo-oxidized cellulose sheets prepared with cationic polymers," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 46, pp. 773–780, 2007.
- [54] T. Saito, S. Kimura, Y. Nishiyama, and A. Isogai, "Cellulose nanofibers prepared by tempo-mediated oxidation of native cellulose," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 2485–2491, 2007.
- [55] M. Henriksson and L. A. Berglund, "Structure and properties of cellulose nanocomposite films containing melamine formaldehyde," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 106, pp. 2817–2824, 2007.
- [56] T. Saito, Y. Nishiyama, J.-L. Putaux, M. Vignon, and A. Isogai, "Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from tempo-catalyzed oxidation of native cellulose," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 6, pp. 1687–1691, 2006.
- [57] S. Beck-Candanedo, M. Roman, and D. G. Gray, "Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 1048–1054, 2005.
- [58] J. Araki, M. Wada, S. Kuga, and T. Okano, "Influence of surface charge on viscosity behavior of cellulose microcrystal suspension," *J Wood Sci*, vol. 45, pp. 258–261, 1999.
- [59] B. Wang, M. Sain, and K. Oksman, "Study of structural morphology of hemp fiber from the micro to the nanoscale," *Appl Compos Mater*, vol. 14, pp. 89–103, 2007.
- [60] J. I. Morán, V. A. Alvarez, V. P. Cyras, and A. Vázquez, "Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers," *Cellulose*, vol. 15, pp. 149–159, 2008.
- [61] E. de Moraes Teixeira, A. C. Corrêa, A. Manzoli, F. de Lima Leite, C. R. de Oliveira, and L. H. C. Mattoso, "Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers," *Cellulose*, vol. 17, pp. 595–606, 2010.
- [62] M. Roohani, Y. Habibi, N. M. Belgacem, G. Ebrahim, A. N. Karimi, and A. Dufresne, "Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites," *European Polymer Journal*, vol. 44, pp. 2489–2498, 2008.
- [63] K. Abe, S. Iwamoto, and H. Yano, "Comparison of the characteristics of cellulose microfibril aggregates isolated from fiber and parenchyma cells of moso bamboo (*phyllostachys pubescens*)," *Cellulose*, vol. 17, pp. 271–277, 2010.

- [64] E. Dinand, H. Chanzy, and M. R. Vignon, "Suspensions of cellulose microfibrils from sugar beet pulp," *Food Hydrocolloids*, vol. 13, pp. 275–283, 1999.
- [65] A. Dufresne, J.-Y. Cavaillé, and V. Michel R, "Mechanical behavior of sheets prepared from sugar beet cellulose microfibrils," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 64, no. 6, pp. 1185–1194, 1997.
- [66] C. Gousse, H. Chanzy, M. L. Cerrada, and E. Fleury, "Surface silylation of cellulose microfibrils: preparation and rheological properties," *Polymer*, vol. 45, pp. 1569–1575, 2004.
- [67] Y. Habibi and M. R. Vignon, "Optimization of cellouronic acid synthesis by tempo-mediated oxidation of cellulose iii from sugar beet pulp," *Cellulose*, vol. 15, pp. 177–185, 2008.
- [68] M. A. S. A. Samir, F. Alloin, M. Paillet, and A. Dufresne, "Tangling effect in fibrillated cellulose reinforced nanocomposites," *Macromolecules*, vol. 37, pp. 4313–4316, 2004.
- [69] A. Dufresne, D. Dupeyre, and M. R. Vignon, "Cellulose microfibrils from potato tuber cells: Processing and characterization of starch-cellulose microfibril composites," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 76, pp. 2080–2092, 2000.
- [70] X. Cao, Y. Chen, P. R. Chang, A. D. Muir, and G. Falk, "Starch-based nanocomposites reinforced with flax cellulose nanocrystals," *eXPRESS Polymer Letters*, vol. 2, no. 7, pp. 502–510, 2008.
- [71] X. Cao, H. Dong, and C. M. Li, "New nanocomposite materials reinforced with flax cellulose nanocrystals in waterborne polyurethane," *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 899–904, 2007.
- [72] X. Cao, Y. Chen, P. R. Chang, M. Stumborg, and M. A. Huneault, "Green composites reinforced with hemp nanocrystals in plasticized starch," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 109, pp. 3804–3810, 2008.
- [73] N. L. G. de Rodriguez, W. Thielemans, and A. Dufresne, "Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites," *Cellulose*, vol. 13, pp. 261–270, 2006.
- [74] Y. Habibi and A. Dufresne, "Highly filled bionanocomposites from functionalized polysaccharide nanocrystals," *Biomacromolecules*, vol. 9, pp. 1974–1980, 2008.

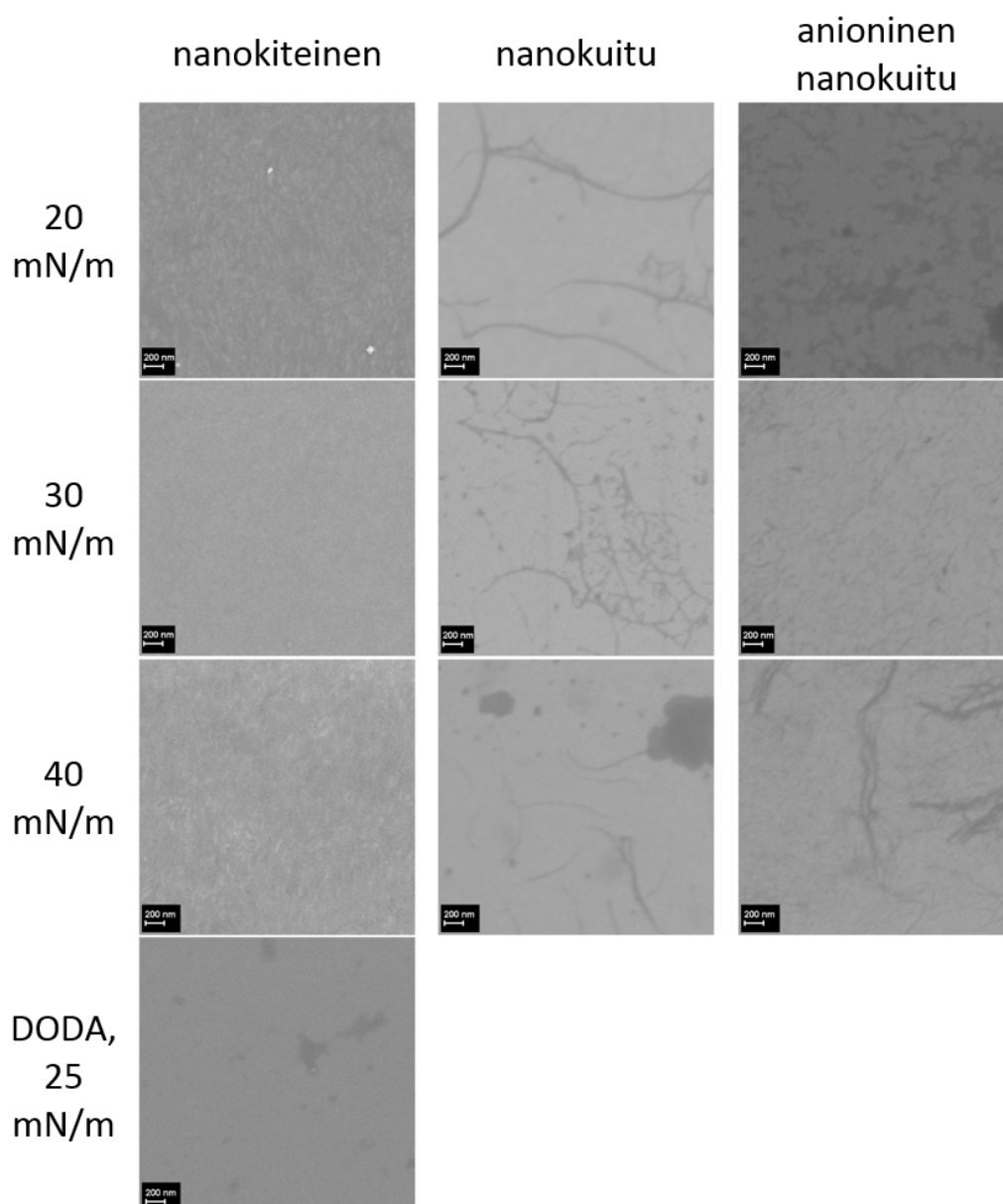
- [75] N. Reddy and Y. Yang, “Biofiber from agricultural byproducts for industrial applications,” *TRENDS in Biotechnology*, vol. 23, no. 1, pp. 22–27, 2005.
- [76] A. Alemdar and M. Sain, “Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues - wheat straw and soy hulls,” *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 1664–1671, 2008.
- [77] D. Bhattacharya, L. T. Germinario, and W. T. Winter, “Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 73, pp. 371–377, 2008.
- [78] R. Zuluaga, J. L. Putaux, J. Cruz, J. Vélez, I. Mondragon, and P. Gañán, “Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 76, pp. 51–59, 2009.
- [79] R. Zuluaga, J.-L. Putaux, A. Restrepo, I. Mondragon, and P. Gañán, “Cellulose microfibrils from banana farming residues: isolation and characterization,” *Cellulose*, vol. 14, pp. 585–592, 2007.
- [80] B. M. Cherian, A. L. Leão, S. F. de Souza, S. Thomas, L. A. Pothan, and M. Kottaisamy, “Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibres by steam explosion,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 81, pp. 720–725, 2010.
- [81] Y. Habibi, M. Mahrouz, and M. R. Vignon, “Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits,” *Food Chemistry*, vol. 115, pp. 423–429, 2009.
- [82] M. F. Rosa, E. S. Medeiros, J. A. Malmonge, K. S. Gregorski, D. F. Wood, L. H. C. Mattoso, G. Glenn, W. J. Orts, and S. H. Imam, “Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 81, pp. 83–92, 2010.
- [83] W. Helbert, J. Y. Cavaillé, and A. Dufresne, “Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. part i: Processing and mechanical behavior,” *Polymer Composites*, vol. 17, no. 4, pp. 604–611, 1996.
- [84] R. Li, J. Fei, Y. Cai, Y. Li, J. Feng, and J. Yao, “Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 76, pp. 94–99, 2009.
- [85] Y. Chen, C. Liu, P. R. Chang, X. Cao, and D. P. Anderson, “Bionanocomposites based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull

- fibre: Effect of hydrolysis time,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 76, pp. 607–615, 2009.
- [86] P. Terech, L. Chazeau, and J. Y. Cavaille, “A small-angle scattering study of cellulose whiskers in aqueous suspensions,” *Macromolecules*, vol. 32, pp. 1872–1875, 1999.
- [87] O. van den Berg, J. R. Capadona, and C. Weder, “Preparation of homogeneous dispersions of tunicate cellulose whiskers in organic solvents,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1353–1357, 2007.
- [88] N. Ljungberg, J.-Y. Cavaillé, and L. Heux, “Nanocomposites of isotactic polypropylene reinforced with rod-like cellulose whiskers,” *Polymer*, vol. 47, pp. 6285–6292, 2006.
- [89] M. A. S. A. Samir, F. Alloin, J.-Y. Sanchez, N. E. Kissi, and A. Dufresne, “Preparation of cellulose whiskers reinforced nanocomposites from an organic medium suspension,” *Macromolecules*, vol. 37, pp. 1386–1393, 2004.
- [90] C. Bonini, L. Heux, J.-Y. Cavaillé, P. Lindner, C. Dewhurst, and P. Terech, “Rodlike cellulose whiskers coated with surfactant: A small-angle neutron scattering characterization,” *Langmuir*, vol. 18, pp. 3311–3314, 2002.
- [91] S. Iwamoto, W. Kai, A. Isogai, and T. Iwata, “Elastic modulus of single cellulose microfibrils from tunicate measured by atomic force,” *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 2571–2576, 2009.
- [92] R. Jonas and L. F. Farah, “Production and application of microbial cellulose,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, pp. 101–106, 1998.
- [93] D. Klemm, D. Schumann, F. Kramer, N. Heßler, M. Hornung, H.-P. Schmauder, and S. Marsch, “Nanocelluloses as innovative polymers in research and application,” *Advances in Polymer Science*, vol. 205, pp. 49–96, 2006.
- [94] H. E. Saied, A. H. Basta, and R. H. Gobran, “Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its applications),” *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, vol. 43, no. 3, pp. 797–820, 2004.
- [95] T. Imai, J.-L. Putaux, and J. Sugiyama, “Geometric phase analysis of lattice images from algal cellulose microfibrils,” *Polymer*, vol. 44, pp. 1871–1879, 2003.
- [96] M. Grunert and W. T. Winter, “Nanocomposites of cellulose acetate butyrate reinforced with cellulose nanocrystals,” *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 10, pp. 27–30, 2002.

- [97] A. Hirai, O. Inui, F. Horii, and M. Tsuji, "Phase separation behavior in aqueous suspensions of bacterial cellulose nanocrystals prepared by sulfuric acid treatment," *Langmuir*, vol. 25, pp. 497–502, 2009.
- [98] M. Roman and W. T. Winter, "Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose," *Biomacromolecules*, vol. 5, pp. 1671–1677, 2004.
- [99] J. R. Capadona, K. Shanmuganathan, S. Trittschuh, S. Seidel, S. J. Rowan, and C. Weder, "Polymer nanocomposites with nanowhiskers isolated from microcrystalline cellulose," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 712–716, 2009.
- [100] M. M. de Souza Lima, J. T. Wong, M. Paillet, R. Borsali, and R. Pecora, "Translational and rotational dynamics of rodlike cellulose whiskers," *Langmuir*, vol. 19, pp. 24–29, 2003.
- [101] X. M. Dong, J.-F. Revol, and D. G. Gray, "Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose," *Cellulose*, vol. 5, pp. 19–32, 1998.
- [102] T. Ebeling, M. Paillet, R. Borsali, O. Diat, A. Dufresne, J.-Y. Cavaillé, and H. Chanzy, "Shear-induced orientation phenomena in suspensions of cellulose microcrystals, revealed by small-angle x-ray scattering," *Langmuir*, vol. 15, no. 19, pp. 6123–6126, 1999.
- [103] J. Majoinen, E. Kontturi, O. Ikkala, and D. G. Gray, "Sem imaging of chiral nematic films cast from cellulose nanocrystal suspensions," *Cellulose*, vol. 19, pp. 1599–1605, 2012.
- [104] J. Araki, M. Wada, S. Kuga, and T. Okano, "Birefringent glassy phase of a cellulose microcrystal suspension," *Langmuir*, vol. 16, pp. 2413–2415, 2000.
- [105] D. Bondeson, A. Mathew, and K. Oksman, "Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis," *Cellulose*, vol. 13, pp. 171–180, 2006.
- [106] C. D. Edgar and D. G. Gray, "Smooth model cellulose surfaces from nanocrystal suspensions," *Cellulose*, vol. 10, pp. 299–306, 2003.
- [107] J. Araki, M. Wada, S. Kuga, and T. Okano, "Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 142, pp. 75–82, 1998.

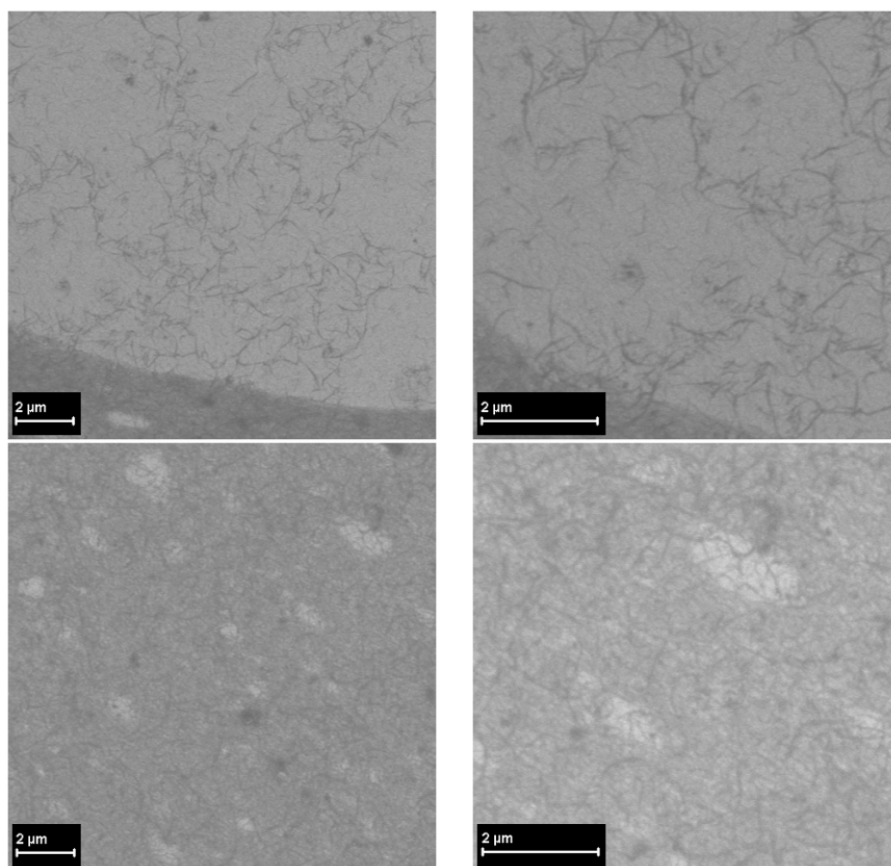
- [108] M. Holmberg, J. Berg, S. Stemme, L. Ödberg, J. Rasmusson, and P. Claesson, “Surface force studies of langmuir-blodgett cellulose films,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 186, pp. 369–381, 1997.
- [109] N. Masruchin, B.-D. Park, V. Causin, and I. C. Um, “Characteristics of tempoxidized cellulose fibril-based hydrogels induced by cationic ions and their properties,” *Cellulose*, vol. 22, pp. 1993–2010, 2015.
- [110] “Introducing: Human recombinant laminin matrices - key to stem cell biology,” Tech. Rep. 1.1, BioLamina, BioLamina AB, Löfströms Allé 5A, 172 66 Sundbyberg, Sweden, 2010.
- [111] A. E. Sorkio, E. P. Vuorimaa-Laukkanen, H. M. Hakola, H. Liang, T. A. Ujula, J. J. Valle-Delgado, M. Österberg, M. L. Yliperttula, and H. Skottman, “Biomimetic collagen i and iv double layer langmuir-schaefer films as microenvironment for human pluripotent stem cell derived retinal pigment epithelial cells,” *Biomaterials*, vol. 51, pp. 257–269, 2015.
- [112] H. Paukkonen, A. Ukkonen, G. Szilvay, M. Yliperttula, and T. Laaksonen, “Hydrophobin-nanofibrillated cellulose stabilized emulsions for encapsulation and release of bcs class ii drugs,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, pp. 238–248, 2017.

LIITE A. LISÄÄ SEM-KUVIA



Kuva 1 Kuvissa on nanokiteisen selluloosan ja DODA:n, selluloosananokuidun ja DODA:n, anionisen selluloosananokuidun ja DODA:n sekä pelkän DODA:n muodostamat kalvot kuvattuna pyyhkäisyelektronimikroskoopilla 50 000-kertaisesti suurennettuna. Kaikkien selluloosamateriaalien kalvot on kasvatettu pintapaineissa 20 mN/m, 30 mN/m ja 40 mN/m. DODA:n muodostama kalvo on kasvatettu pintapaineessa 25 mN/m. Mitään kalvoista ei ole päällystetty platinalla. Kiihdytysjännitteenä on käytetty 2 kV nanokiteisen selluloosan kalvoille ja DODA:lle ja 0,5 kV nanokuituisten selluloosien kalvoille.

10 000-kertainen suurennos 20 000-kertainen suurennos



Kuva 2 Kuvissa on nanokiteisen selluloosan ja kollageeni 1:n muodostama kalvo pintapaineessa 15 mN/m kuvattuna pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Kiihdytysjännitteenä on käytetty 0,5 kV. Eri kohdissa kasvatettua kalvoa rakenne näytti erilaiselta